



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií



Biokompatibilní povrchové modifikace polyethylentereftalátu zaměřené na biomedicínské aplikace

Bakalářská práce

Studijní program: B3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R002 – Nanomateriály
Autor práce: **Hana Šinkorová**
Vedoucí práce: Mgr. Veronika Zajícová, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Biocompatible Surface Modifications of Poly(ethylene Terephthalate) Focused on Biomedical Applications

Bachelor thesis

Study programme: B3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942R002 – Nanomaterials
Author: **Hana Šinkorová**
Supervisor: Mgr. Veronika Zajícová, Ph.D.



Technická univerzita v Liberci
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Hana Šinkorová**
Osobní číslo: **M14000147**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Biokompatibilní povrchové modifikace polyethylentereftalátu
zaměřené na biomedicínské aplikace**
Zadávací katedra: **Katedra chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracování rešerše týkající se využití polyethylentereftalátu (PET) v medicíně z hlediska ekonomického a aplikačního. Uvést výhody a nevýhody využití zdravotnických prostředků z PET. Porovnat v rámci ČR a celosvětově. Zmínit problematiku PET, patogenních biofilmů a infekcí, opět porovnat v rámci ČR, EU a ostatních států.
2. Povrchové modifikace PET folií pomocí reakcí s Grignardovými činidly.
3. Charakteristika modifikovaných povrchů různými metodami (SEM, AFM, měření kontaktního úhlu, volné povrchové energie).
4. Testování a vyhodnocování biokompatibility a antimikrobiální aktivity modifikovaných povrchů.

Rozsah grafických prací: dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 40-50 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

1. Taubert, A., Mano, João F., Rodríguez-Cabello, Carlos J. (Eds.). 2013 Biomaterials Surface Science; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013; 581 p. ISBN (print) 9783527330317. ISBN (online) 9783527649600.
2. Munoz-Bonilla, A., Cerrada, M., Fernández-García, M. (Eds.). 2013 Polymeric Materials with Antimicrobial Activity: From Synthesis to Application; RSC Polymer Chemistry Series, 2013; 414 p. ISBN 978-1-84973-807-1. PDF eISBN 978-1-78262-499-8.
3. Pignatello, R. (Ed.). 2013 In Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications; Intech: Croatia, 2013; 568 p. ISBN 978-953-51-1051-4.
4. Treter, J., Macedo, A. J. Catheters: a suitable surface for biofilm formation. FORMATEX 2011, 835-842.
5. Vertes, A. et al. Analytical Challenges of Microbial Biofilms on Medical Devices. Anal. Chem. 2012, 84, 38583866.
6. Webb, H. K. et al. Poly(ethylene terephthalate) Polymer Surfaces as a Substrate for Bacterial Attachment and Biofilm Formation. Microbes and Environments 2009, 24(1), 39-42.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Veronika Zajícová, Ph.D.

Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: 10. října 2016

Termín odevzdání bakalářské práce: 15. května 2017

prof. Ing. Zdeněk Pliva, Ph.D.
děkan



prof. Ing. Josef Sedlbauer, Ph.D.
vedoucí katedry

V Liberci dne 10. října 2016

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 15. 5. 2017

Podpis: Pinkorova!

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala mé vedoucí Mgr. Veronice Zajícové Ph.D. za velikou trpělivost, ochotu a dobré připomínky k této práci. Také bych chtěla poděkovat specialistce této práce M.Sc. Sumitě Swar, která mi vždy s ochotou předávala drahocenné zkušenosti. Stejně tak bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali s testováním vzorků. Konkrétně Ing. Janě Müllerové, Ph.D., Ing. Pavlu Kejzlarovi, Ph.D., Ing. Lukáši Voleskému, Petře Šubrtové, Ing. Miroslavě Rysové, Ing. Adamu Pazourkovi, Ph.D. a Ing. Janu Grégrovi.

Za příjemné přijetí do kolektivu, navození pohodové atmosféry a udělení mnoha užitečných rad bych chtěla poděkovat týmu laboratoře syntézy nanomateriálů, zejména prof. Ivanu Stiborovi, CSc., RNDr. Michalu Řezankovi, Ph.D., Ing. Janu Lukáškoví, Mgr. Janě Karpíškové a mému spolužákovi Marcelu Havrdovi. Za velkou oporu při studiu bych chtěla poděkovat mé milující rodině a přáteli.

ANOTACE

Tato práce je zaměřena na povrchovou modifikaci polyethylentereftalátových (PET) fólií, snižující, případně zabraňující adhezi bakterií k povrchu a následné tvorbě biofilmu. K modifikaci byla použita Grignardova činidla o různě dlouhém alkylovém řetězci (CH_3MgBr , $\text{C}_4\text{H}_9\text{MgCl}$, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{MgCl}$, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{MgCl}$ a $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{MgBr}$). Modifikované povrchy byly podrobeny testování kontaktního úhlu vody (WCA) a volné povrchové energie (FSE), které vypovídají o hydrofobicitě modifikovaných vzorků. Dále byly připravené vzorky testovány pomocí infračervené spektroskopie (FTIR), rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) a mikroskopie atomárních sil (AFM). Při zkoumání adheze bakterií k modifikovaným povrchům byly použity tři patogenní bakteriální kmeny, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Kromě testování adheze bakterií k modifikovaným povrchům, byla testována i adheze buněk a jejich následná proliferace.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyethylentereftalát, povrchová modifikace, Grignardova činidla, biofilm, biokompatibilita

ANNOTATION

This work deals with the surface modification of polyethyleneterephthalate (PET) foils decreasing (preventing) adhesion of bacteria to the surface and subsequent biofilm formation. Grignard reagents of a different length alkyl chain (CH_3MgBr , $\text{C}_4\text{H}_9\text{MgCl}$, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{MgCl}$, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{MgCl}$ and $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{MgBr}$) were used to modify the surface. Thus prepared samples were analysed by different surface techniques including water contact angle (WCA) and free surface energy (FSE) measurements, which give us fundamental information about the changes in hydrophobicity of the modified samples. Samples were subsequently analysed by infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). Three pathogenic bacterial strains were used to examine the adhesion of bacteria to the modified surfaces namely *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Moreover, to confirm the biocompatibility of the prepared samples cell adhesion and proliferation were determined.

KEYWORDS

Polyethyleneterephthalate, surface modification, Grignard reagents, biofilm, biocompatibility

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFM	Mikroskopie atomárních sil (Atom Force Microscopy)
BSE	Zpětně odražené elektrony
DEE	Diethylether
DMEM	Dubleccovo modifikované Eaglovo médium
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDS	Elektronově disperzní spektroskopie
EOS	Stavová rovnice (Equation of state)
ESEM	Environmentální rastrovací elektronová mikroskopie
EXPS	Extracelulární polymerní substance
FBS	Fetální bovinní sérum
FSE	Volná povrchová energie (Free surface energy)
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
G-	Gramnegativní bakterie
G+	Grampozitivní bakterie
HDPE	Vysokohustotní polyethylen (High-density polyethylene)
IR	Infračervené záření (Infrared)
KTJ (CFU)	Kolonii tvořící jednotka (Colony Forming Units)
LDPE	Nízkohustotní polyethylen (Low-density polyethylene)
MTT	Test metabolické aktivity buněk
NBCS	Telecí sérum

<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PES	Polyesterové vlákno
PET (PETP, PET-P)	Polyethylentereftalát
PP	Polypropylen
PVC	Polyvinylchlorid
PMMA	Polymethylmethakrylát
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	Sekundární elektrony
SEM	Sekundární elektronová mikroskopie (Scanning Electron Microscopy)
UHMWPE	Utra vysokomolární polyethylen (Ultra-high-molecular-weight polyethylene)
XPS	Rentgenová fotoelektronová spektroskopie (X-ray photoelectron spectroscopy)

OBSAH

1. Úvod	12
2. Teoretická část	13
2.1. Polymery v současné medicíně	13
2.1.1. Polyethylen	13
2.1.2. Polypropylen	14
2.1.3. Polyvinylchlorid	15
2.1.4. Polymethylmethakrylát	15
2.1.5. Polyethylentereftalát	15
2.1.5.1. Obecná charakteristika	16
2.1.5.2. Vlastnosti	17
2.1.5.3. Modifikace	17
2.1.5.4. Výroba	18
2.1.5.5. Využití	19
2.2. Biofilm	20
2.2.1. Charakteristika biofilmu	20
2.2.2. Vývojové fáze biofilmu	21
2.2.2.1. Adheze	21
2.2.2.2. Růst	21
2.2.2.3. Šíření	22
2.2.3. Biofilm ve zdravotnictví	22
2.2.4. Patogenní bakteriální kmeny	23
2.2.4.1. <i>Escherichia coli</i>	24
2.2.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.2.4.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
3. Použité experimentální metody	27
3.1. Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	27

3.2. Kontaktní úhel vody	27
3.3. Volná povrchová energie	28
3.4. Mikroskopie atomárních sil	29
3.5. Skenovací elektronová mikroskopie	30
4. Experimentální část	31
4.1. Použité chemikálie	31
4.2. Modifikace povrchů	31
4.2.1. Příprava	31
4.2.2. Funkcionalizace	32
4.3. Testování vlastností povrchů připravených vzorků	33
5. Výsledky a diskuze	36
5.1. Výsledky měření infračervené spektroskopie	36
5.2. Analýzy měření kontaktního úhlu	36
5.3. Analýzy měření volné povrchové energie	39
5.4. Změny morfologie modifikovaných vzorků	41
5.5. Změny drsnosti modifikovaných vzorků	42
5.6. Výsledky testů biofilmu	44
5.7. Cytotoxicita a biokompatibilita připravených vzorků	47
6. Závěr	51
7. Použitá literatura	52
8. Přílohy	52

1. ÚVOD

V posledních letech je pozorován rozvoj polymerních materiálů v medicíně, kde každým rokem stoupá množství zpracovaného polymeru. Obecně mají přírodní polymery daleko větší uplatnění ve zdravotnictví než polymery syntetické.

V současné době se zvyšuje užívání umělých, polymerních tělních implantátů, s tím souvisí také větší míra infekcí týkajících se vzniku biofilmu na implantátech. Ve světě kontinuálně narůstá snaha o snížení výskytu biofilmu, případně zabránění jeho vzniku. Vlivem neustále narůstající rezistence bakterií (v biofilmu jsou navíc až 1000 resistantnější), je léčba infekcí způsobených vznikem biofilmu velice problematická.

Předpokladem pro dobrý tělní implantát je jeho biokompatibilita, mechanická odolnost dobrá tvárnost a samozřejmě i nízká cena. Biokompatibilita zaručuje možnost využití ve zdravotnictví, na druhou stranu jsou tyto materiály vhodné i pro kolonizování bakteriemi. Snížení adheze mikroorganismů k povrchu polymerů lze dosáhnout povrchovou úpravou, kdy se může měnit chemické složení povrchu, případně jeho morfologie.

Adheze bakterií může být z velké části ovlivněna povrchovou úpravou polymerních materiálů. Hlavním cílem této práce je eliminace adheze mikroorganismů k povrchu polyethylterftalátu pomocí povrchové chemické modifikace Grignardovými činidly. Při zachování mechanických vlastností materiálů a zisku potřebných chemických a biologických vlastností modifikovaného povrchu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. POLYMERY V SOUČASNÉ MEDICÍNĚ

Zdravotnické prostředky, jako jsou protézy, implantáty pro náhradu kostní dutiny, katétrů a pomůcky na dodávání léků, jsou nejčastěji tvořeny polymery vyrobenými většinou z následujících materiálů: polyethylen (PE), polyethylentereftalát (PET), silikonový kaučuk, polydimethylsiloxan (SR), polymethylmethakrylát (PMMA), polypropylen (PP), polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon®), polyvinylchlorid (PVC) a polyuretan (PU). Požadovanými vlastnostmi těchto materiálů jsou jejich biokompatibilita, mechanické vlastnosti, snadné tvarování a nízké náklady.¹

Co se týče využití dalších polymerů ve zdravotnictví, zmíním se především o polyethylen (PE), polypropylen (PP), polyvinylchloridu (PVC), polymethylmethakrylátu (PMMA) a polyethylentereftalátu (PET). Jak je vidět v tabulce 1, ve zdravotnictví se opravdu využívá velké množství různých polymerů, a to zdaleka není vše.

Tabulka 1 Aplikace různých polymerů v medicíně.²

Použití	Polymer
cévy	PVC, polyester
fixace zlomenin	PMMA
kardiostimulátor	polyethylen
klouby a kosti	akryláty, nylon, silikon, PP, UHMWPE
kolenní klouby	PE, PP, PVC
obličejové protézy	akryláty, PVC
segmenty jícnu	PE, PP, PVC
tracheální trubice	akryláty, nylon, silikon
zubní protézy	akryláty, epoxidy, UHMWPE

2.1.1. POLYETHYLEN

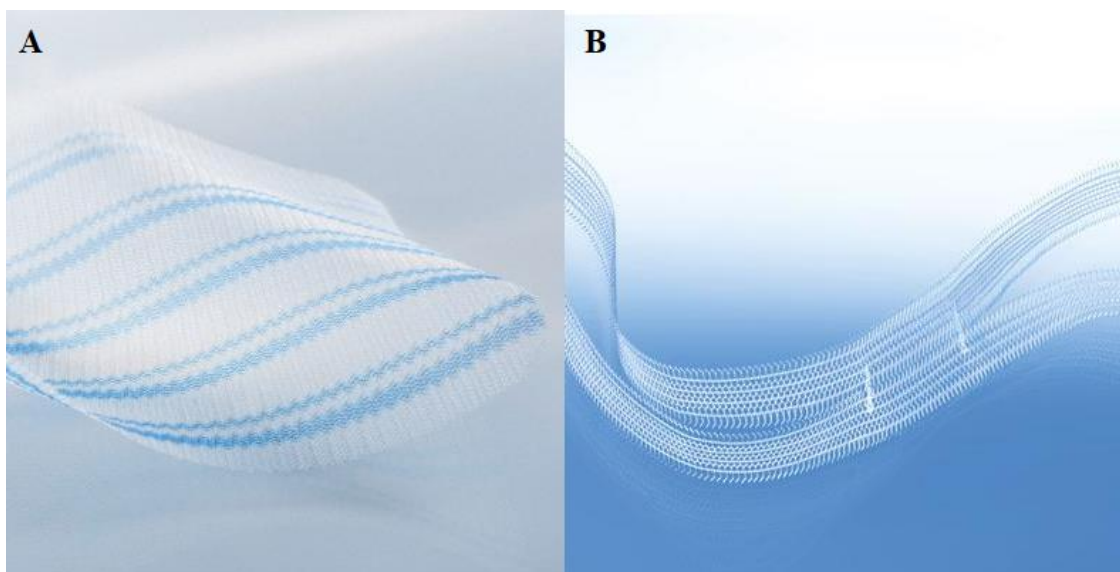
Polyethylen, jak je známo, se vyrábí vícero druhů. Nízkohustotní LDPE neboli Low-density polyethylen má nízké náklady, a proto je ve zdravotnictví hojně využíván na pomůcky na jednorázové použití, jako jsou injekční stříkačky, nitrožilní vaky, epidurální katétrů, rukavice, zástěry a další. Vysokohustotní HDPE (high-density PE) a ultra vysokomolekulární UHMWPE (ultra-high molecular weight PE) jsou využívány pro výrobu farmaceutických přístrojů, též jako výplně pro různé implantáty.



Obrázek 1 Kyčelní kloub – vložka UHMWPE firmy Endoimplant.³

2.1.2. POLYPROPYLEN

Široké uplatnění ve zdravotnictví našel polypropylen. Největší část PP ve zdravotnictví (přibližně 37 %) je spotřebována na výrobu netkaných textilií, které jsou využívány především na ochranné pomůcky, jako jsou masky, filtry, ochranné oblečení a další. Dále je poměrně velké množství tohoto polymeru (24 %) využíváno na zdravotnické pomůcky (injekční stříkačky, nitrožilní vaky, stehy a jiné), také na laboratorní pomůcky (centrifugační zkumavky, zkumavky na odběry tělních tekutin, špičky pipet aj.) (15 %) a na jejich uschovávání, především pro zachování sterility pomůcek (15 %). Nejmenší část PP ve zdravotnictví (9 %) je využito na různé obaly od léků (inhalátory, nosní spreje aj.).



Obrázek 2 Výrobky z polypropylenu užívané ve zdravotnictví. (A) Extra lehká síťka Optilene® používaná pro kýlní operace.⁴ (B) Dvojitá páska I-STOP®TOMS® ze 100 % monofilního polypropylenu navržena pro léčbu stresové inkontinence mužů. Existuje alternativa i pro léčbu ženské inkontinence.⁵

2.1.3. POLYVINYLCHLORID

Vzhledem k tomu, že čistá forma PVC nevyhovuje svojí pevností, jsou do PVC často přidávána různá aditiva, ta však mohou být toxická pro organismus, proto se PVC používá ve zdravotnictví spíše na externí pomůcky (hadičky k transfuzím, dialýzám, vaky s krví atd.) Najdete jej ale i jako krevní a močové katétr, kanyly, dialyzační sety, identifikační náramky atd. I přes snahu v posledních letech nahradit jej polymerem, který není měkčený, je PVC nejpoužívanější polymer ve zdravotnictví.⁶



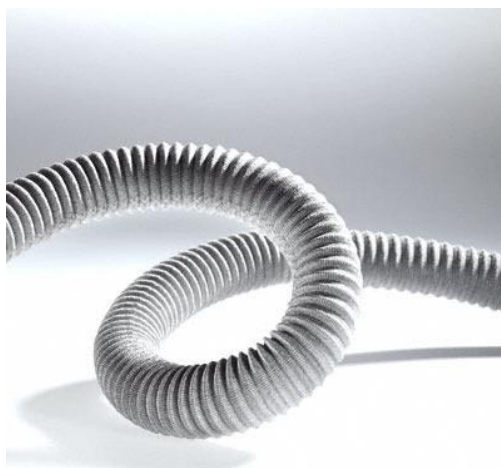
Obrázek 3 Krevní vak.⁷

2.1.4. POLYMETHYLMETHAKRYLÁT

Polymethylmethakrylát (PMMA) známý také pod názvem plexisklo, je využíván ve zdravotnictví především na zubní protézy nebo transplantáty.⁸ Z tohoto polymeru jsou mimo jiné vyráběny také inkubátory pro nedonošené novorozence.⁹

2.1.5. POLYETHYLENTEREFTALÁT

V poslední době je polyethylentereftalát (PET) jedním z nejvyužívanějších polymerů v medicíně. Nejčastější podoba PET užívaného ve zdravotnictví je biokompatibilní a chemicky inertní vlákno s technickým názvem Dacron.¹⁰ Především se používá na výrobu textilií využívaných ve zdravotnictví, ale z dacronové stříže se dají plést, případně tkát také umělé cévy. Spolu s různými povlaky je často využíván na chirurgické sítky, ale také na srdeční chlopně, cévní štěpy, krevní a močové katétr a mnoho dalších.³ Cévní štěpy z PET bývají potaženy kolagenem, o močových katétrech je k dispozici minimální množství informací. PET v kombinaci s polyakrylamidem, nebo se sodnou solí kyseliny polyakrylové vyvolávají protizánětlivou reakci v makrofágách. V jiném případě, pokud je PET zkombinován s polyethylenglykolem (PEG) nebo s oligoethylenglykolem, může být vyroben antitrombotický materiál.^{11–13}



Obrázek 4 Pletená dvojitá velurová vaskulární protéza z polyesteru (kombinace polyethyltereftalátu a pegoterátu) nazývaná Silver Graft.¹⁴

2.1.5.1. Obecná charakteristika

Polyethyltereftalát bývá nejčastěji označován zkratkou PET, poměrně časté bývá i použití zkratky PETE nebo PETP popř. PET-P.

O objev polyethyltereftalátu se na počátku 30. let minulého století zasloužila americká společnost E. I. du Pont de Nemours and Company známější spíše pod názvem DuPont. První patent na jeho výrobu byl podán pracovníky britské firmy Calcio Printer Johna Rexe Whitfielda a Jamese Tennanta Dicksona již roku 1949.¹⁵

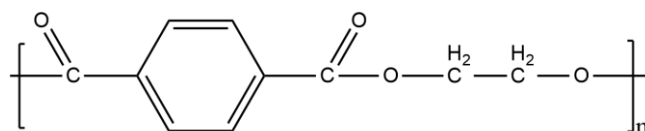


Schéma 1 Strukturní vzorec polyethyltereftalátu.

PET je nejznámějším a nejvýznamnějším polymerem ze zástupců termických polyesterů. Charakteristickým znakem polyesterů je přítomnost esterových funkčních skupin v hlavním makromolekulárním řetězci. Za polyestery jsou tedy označovány polymery s obecným vzorcem $[-\text{R}_1-\text{CO}-\text{O}-\text{R}_2-]_n-$.

Polyestery se dělí na dvě základní skupiny:

- ❖ Termoplastické (lineární) – polymery odvozené od kyseliny tereftalové a uhličitě.
- Obecně se na výrobu těchto polyesterů používá dikarboxylová kyselina a dvojsytný

alkohol. Typickými zástupci této skupiny polyesterů jsou například již zmíněný PET, nebo polykarbonáty.

- ❖ Reaktoplastické (větvené, zesíťované) – polymery, které přecházejí z lineárního stavu do zesíťovaného. Tato přeměna je prováděna nevratnou chemickou reakcí. Do této kategorie polyesterů spadají tzv. polyesterové pryskyřice.

2.1.5.2. Vlastnosti

Vzhledem k tomu, že polyethyltereftalát je semikrystalický polymer, liší se jeho vlastnosti (hustota, tuhost, vzhled atd.) čistě amorfního typu PET a PET, u kterého proběhla krystalizace. Obecně je PET znám a ve velkém množství využíván díky své vysoké mechanické pevnosti, odolnosti vůči otěru a snadnému zpracování. Fyziologicky nezávadný PET hoří žlutým plamenem. PET se zpracovává do dvou různých forem. Obě formy polyethyltereftalátu mají rozdílné vlastnosti, které ovlivňují i jejich následné použití.

- ❖ První ze dvou druhů PET se nazývá polyethyltereftalátové vlákno. Společně s vlákny z polybutyltereftalátu a polytrimethyltereftalátu tvoří tzv. skupinu polyesterových vláken. Tato skupina se označuje zkratkou PES. V porovnání s vlnou se PET vlákno méně mačká a lépe schne, oproti polyamidu je stálejší na světle. Při kontaktu se zředěnými kyselinami a hydroxidy vykazuje značnou stálost s koncentrovanými roztoky amoniaku nikoliv.
- ❖ Polyethyltereftalátové fólie jsou druhou formou polyesterů. Tyto fólie se vyznačují vysokou mechanickou pevností. Svou pružnost si zachovávají i při nízkých teplotách až do $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. PET fólie nepropouští vlhkost ani plyny, vykazují dobré elektroizolační vlastnosti a jsou dobře zpracovatelné.

2.1.5.3. Modifikace

Lepších vlastností se snažíme dosáhnout modifikací jednotlivých polymerů. K dispozici máme hned několik možností modifikace.

- ❖ Fyzikální modifikace – nejjednodušší způsob modifikace polymeru, při kterém dochází k mechanickému míšení dvou nebo více polymerů.
- ❖ Mechano-chemické modifikace – na tomto typu modifikace se podílejí aktivní částice, které vznikají při mechanické destrukci makromolekulárních řetězců.
- ❖ Chemické modifikace – úmyslně dochází k přeměně chemické struktury za určitých podmínek, nebo působením jiných chemických látek. U polymerů lze rozdělit chemické modifikace na ty, při kterých nedochází ke změně střední molekulové

hmotnosti nesoucí název polymeranalogické přeměny a na modifikace, při kterých se střední molekulová hmotnost nezachovává. Typickým příkladem modifikací, u kterých dochází ke změně střední molekulové hmotnosti, je síťování polymeru.

V posledních letech se nejen u polymerů často hovoří o povrchových úpravách pomocí nanovrstev. Nanesením nanovrstvy na povrch materiálu můžeme docílit například zlepšení odolnosti vůči korozi a mechanickým otěrům, nebo požadovaných třecích vlastností. Nanášení vrstev probíhá také z estetických důvodů.

Povrchová modifikace PET, za účelem změny drsnosti, hydrofobicity, barevnosti a mnoha dalších vlastností, představuje důležitý pokrok v oblasti biomateriálů, moderních textilií nebo filtrací. Dosažení povrchové modifikace PET použitím různých roztoků se obecně považuje za velmi složité. Vhodnými metodami jak dosáhnout efektivní modifikace, jsou hydrolyza, která zapříčiní vznik hydroxylových a karboxylových funkčních skupin a aminolýza, která způsobí vznik aminových skupin.^{16,17}

2.1.5.4. Výroba

Výrobu polyethyltereftalátu lze provádět dvěma způsoby, většinou dvoufázově. Při výrobách je použita jako výchozí látka kyselina tereftalová nebo její dimethylester, popřípadě ftalanhydrid společně s ethylenglykolem. Vlákna se vyrábějí tažením z taveniny a fólie vytlačováním.

V prvním případě výroby polyethyltereftalátu je výchozí látkou dimethyltereftalát, který reaguje s nadbytkem ethylenglykolu v tavenině (schéma 2). Tato reakce probíhá za teploty 150 °C až 200 °C, jako vedlejší produkt vzniká metanol, který je z reakce odstraňován destilací. Za vyšší teploty je následně vakuovou destilací odstraněn i přebytek ethylenglykolu. V další fázi, tzv. transesterifikační fázi, která probíhá při teplotách 270 °C - 280 °C v atmosféře dusíku, dochází k opětovnému odstraňování přebytku ethylenglykolu.

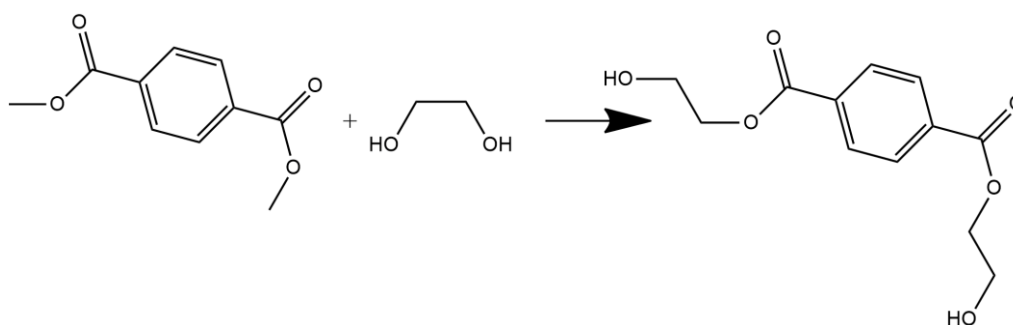


Schéma 2 Výroba PET dimethyltereftalátovým procesem.

U druhého způsobu výroby se vychází z kyseliny tereftalové, ke které se opět přidává ethylenglykol (schéma 3). Esterifikace probíhá při teplotách 220 °C až 260 °C a při tlaku 0,27 MPa-0,55 MPa. Jako vedlejší produkt vzniká voda, která je z reakce oddestilována. Při tomto způsobu výroby vzniká polyethylentereftalát o vyšší molekulové hmotnosti.

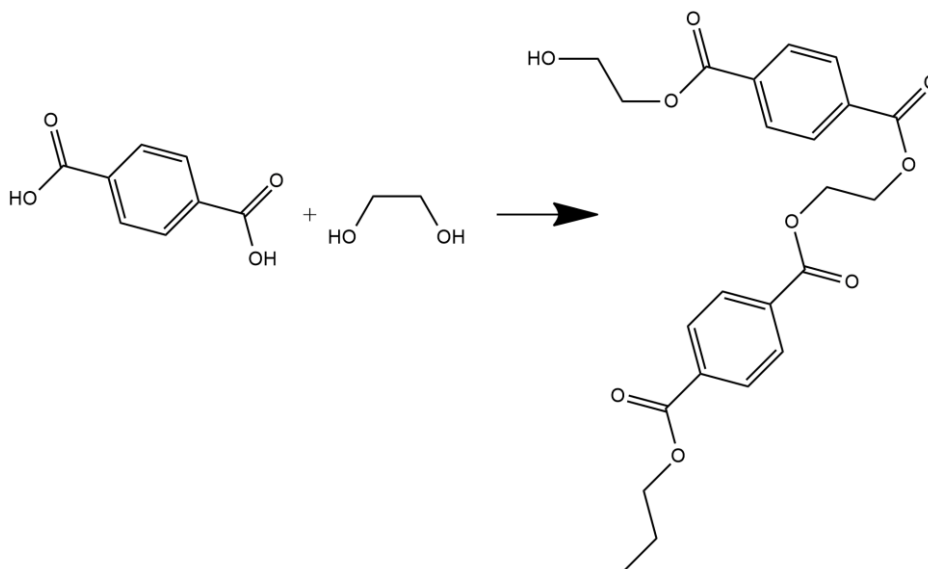


Schéma 3 Výroba PET z kyseliny tereftalové.

2.1.5.1. Využití

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.5.2., existují různé formy polyethylentereftalátu s odlišnými vlastnostmi. Odlišnost vlastností různých druhů PET si vyžaduje i odlišné použití.

Největší část, přibližně 65% z celkové výroby PET, se spotřebovává na výrobu syntetických vláken. Tato vlákna mají velký význam v textilním průmyslu. V současné době je velice populární funkční prádlo právě z polyesterových vláken, které je určeno na sportování. Lana ze syntetických vláken jsou vyráběna pro své dobré vlastnosti, jako je pevnost, otěr a odolnost proti větru. Kromě zpracování syntetických vláken na lana a plachty, se tato vlákna užívají také jako izolace elektrického proudu, nebo jako výstuže do dopravních pásů a pneumatik. Syntetická vlákna lze kombinovat s bavlnou, vlnovou, viskozovou a polyakrylovou stříží.

Dalších 30 % z celkové výroby PET je využito na vyfoukávání PET lahví. Kromě minerálních vod určených na pití, jsou tyto nádoby určeny k uchovávání krémů, šamponů a mnoha dalších tekutin.

Posledních 5 % je využito v obalovém průmyslu. Kromě toho se fólie využívají také v elektronice jako izolanty při výrobě kondenzátorů. V automobilovém průmyslu se polyethylentereftalátové fólie přilepují ke sklům aut, kde v případě rozbití skla udržují jeho celistvost.

2.3. BIOFILM

Je obecně známo, že v přírodním prostředí mají bakterie tendenci přisedat k různým povrchům. Bakterie se kromě přírodních prostředí vyskytují i v prostředích humánních, kde jejich působením dochází ke znečištění povrchů, ke korozi, která vede k degradaci povrchu a v neposlední řadě k infekčním onemocněním. Biofilm lze každodenně pozorovat v našem okolí ve sprchách, na WC, dokonce ho lze pozorovat i na nás např. zubní plak.

2.3.1. CHARAKTERISTIKA BIOFILMU

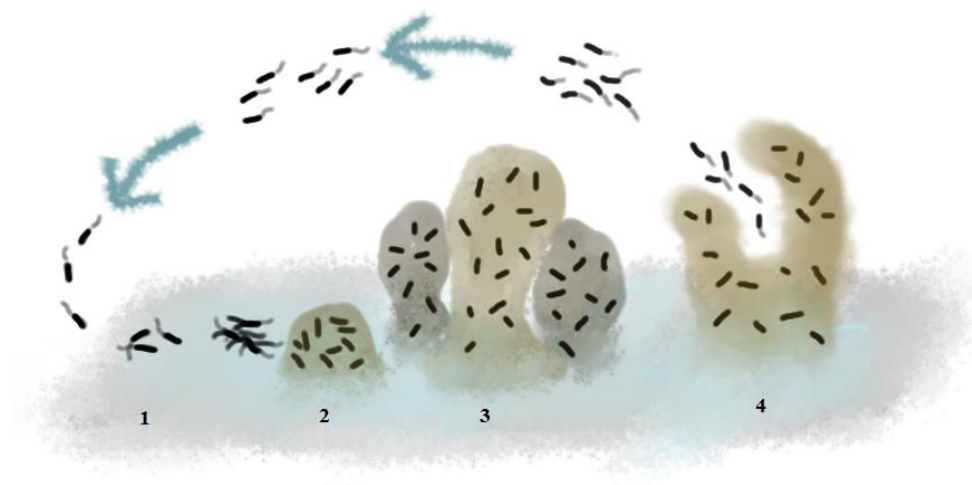
Podle jedné z prvních definic uvedených biology je biofilm „aktivní mikrobiologická vrstva složená z mikroorganismů (bakterií, řas, hub, prvoků, mnohobuněčných) a jejich extracelulárních polymerních produktů, která je přichycena na povrchu nejrůznějších podkladů, které jsou v kontaktu s vodou“.¹⁸ Od té doby dochází stále k vývoji definic. Novější definice již zahrnují do svého znění rovněž fyziologické vlastnosti biofilmu a transkripci genů, čímž dochází ke změně fenotypu.¹⁹

Biofilm je pro bakterie výhodnější forma života. Oproti planktonickým buňkám poskytuje biofilm buňkám ochranu a usnadňuje adhezi dalším mikroorganismům. Bakterie žijící v biofilmu mají lepší odolnost vůči mechanickému poškození, toxickým látkám, bakteriofágům i UV záření. Při výskytu v tělech živočichů jsou tyto bakterie navíc odolnější vůči imunitnímu systému a antibiotikům. U bakterií nacházejících se ve společenství, byla pozorována zvýšená metabolická aktivita, čehož se plně využívá v průmyslu.

Co se týče struktury biofilmu, ta je ovlivněna několika faktory. Jedním z nich je faktor fyzikální, který zahrnuje například transport živin a velikost odtrhávajících sil. Další biologický faktor zahrnuje konverzi substrátu, či množení bakterií.²⁰ Biofilm v posledním stádiu vývoje má heterogenní strukturu. Matrice, v níž jsou rozptýleny bakterie a skupiny bakterií, obsahuje také mezery a kanálky, které jsou propojeny s okolní tekutinou.^{21,22}

2.3.2. VÝVOJOVÉ FÁZE BIOFILMU

Celý proces vzniku, vývoje a šíření biofilmu můžeme rozdělit do několika vývojových fází, které jsou zachyceny na obrázku 5. První vývojovou fází je adheze tzv. primárních kolonizátorů k povrchu. Následuje množení těchto bakterií a tvorba slizu a tím biofilm roste. Během toho přisedají sekundární bakterie. Jako poslední dojde k uvolnění bakterií zpět do okolní tekutiny a dochází k šíření biofilmu.



Obrázek 5 Vývojové fáze biofilmu. 1) adheze bakterie k povrchu, 2) produkce EXPS, 3) růst biofilmu, 4) uvolnění bakterií do okolí. Opakování celého cyklu (H. Šinkorová).

2.3.2.1. Adheze

Klíčovým krokem pro vznik biofilmu je poměrně složitý proces adheze buněk k povrchu. Mikroorganismy, které jako první přisednou k povrchu, jsou nazývány primárními kolonizátory. Přichycení buněk k povrchu bývá zprostředkováno interakcemi. První možné interakce jsou založeny na fyzikálních silách, mezi které patří Van der Waalsovy síly, elektrostatické a hydrofobní interakce. Další možnosti jsou nespecifické chemické vazby, jako jsou kovalentní polární vazby, nebo vodíkové vazby. Poslední možnosti jsou specifické interakce mezi receptory hostitele a bakteriálními receptory. Adheziny nazýváme specifické povrchově aktivní molekuly, které bakterie využívají při adhezi k povrchu. Adheziny mohou být bílkoviny, polysacharidy nebo glykopeptidy.^{22,23}

2.3.2.2. Růst

Po přichycení primárních kolonizátorů k povrchu nastává proces množení a následně dochází k regulaci genů. Aktivují se geny, které zapříčiňují produkci polymerů (polysacharidů, bílkovin), důležitých pro vznik biofilmu.¹⁹ Při této fázi je mikroorganismy produkováno velké

množství extracelulární polymerní substance (EXPS), nazývané sliz, který může být různého chemického složení.²⁴ EXPS společně s bakteriemi tvoří základní stavební jednotku biofilmu. S vývojem biofilmu dochází ke změnám podmínek prostředí a může tak docházet k adhezi bakterií do biofilmu, které předtím jen obtížně přisedaly. K biofilmu mohou přisedat i geneticky odlišné druhy bakterií, čímž vzniká mnohodruhový biofilm. Vznik mnohodruhového biofilmu je spojen s procesy koadheze a koagregace.²⁵

Okolní tekutá fáze obklopující biofilm, vstupuje pomocí pórů a kanálků do biofilmu a tím mu dodává živiny. Další její funkcí je odnášení metabolických produktů z jeho okolí. Jsou dva druhy transportu látek u biofilmu. Prvním z nich je transport externí, u kterého dochází k výměně látek mezi okolní kapalinou a biofilmem. Druhý, tzv. interní transport, zahrnuje předávání látek vně biofilmu. Nejspíše vzhledem k heterogenní struktuře je transport látek v biofilmu nerovnoměrný.

2.3.2.3. Šíření

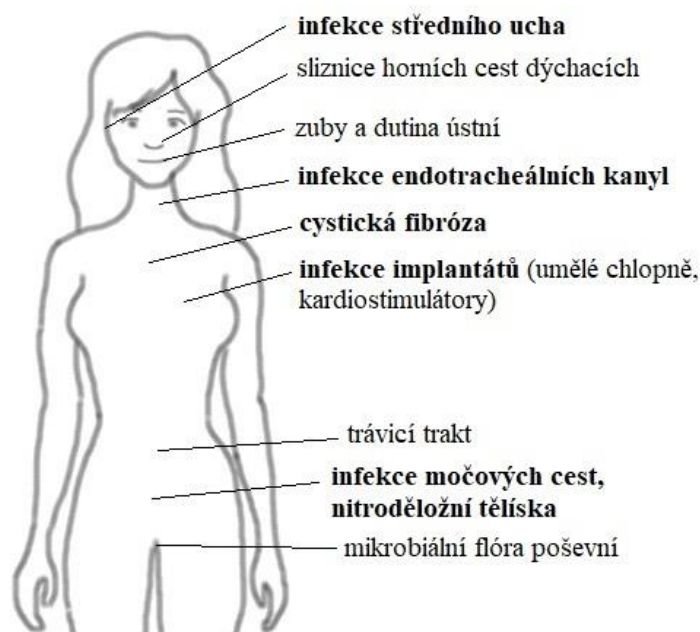
K šíření bakterií dochází uvolněním jednotlivých bakterií a jejich shluků obalených v EXPS zpět do okolní kapaliny. Tudíž je možné chápat proces odtrhávání jako strategii buněk k další kolonizaci.²⁶ K odtrhávání může docházet i působením hydraulických střížných sil nebo vzájemným kontaktním otěrem. K těmto způsobům odtrhávání dochází především v prostředích s proudící kapalinou. U mnohodruhových biofilmů dochází k různým vzájemným interakcím, mimo jiné i ke konkurenci. U té, na rozdíl od planktonních společenstev, kde při vzájemné konkurenci je vždy jeden kmen vyloučen, mohou kmeny existovat pohromadě.

2.3.3. BIOFILM VE ZDRAVOTNICTVÍ

Každoročně se zvyšující užívání polymerních materiálů, zejména pak umělých implantátů a katétrů je hlavní příčinou snahy o eliminaci biofilmu adherovat k povrchu. Působení bakterií v biofilmu, poskytuje těmto mikroorganismům patřičnou rezistenci. Proti desinfekčním přípravkům, antibiotikům i imunitnímu systému jsou infekce způsobené biofilmem velice obtížně léčitelné. Riziko vzniku infekce je ovlivněno způsobem zavedení polymerního materiálu, péčí o něj, dobou, po kterou je zaveden do těla, typem polymeru, ze kterého je vyroben a jeho případnou povrchovou úpravou. Polymerní materiály traumatizují tkáň ve svém okolí, což vede k rozvoji zánětlivé reakce společně s reakcí imunitního systému na cizorodý předmět. Může tedy docházet ke vzniku infekce katétrů, umělých implantátů, cévních protéz, umělých chlopní, nitroděložních tělísek a dalších. Biofilm zapříčiňuje

v našem těle mnoho druhů infekcí (obrázek 6). S biofilmem se často spojují infekční onemocnění typu periodontida-záněty týkající se dásní a zubů, pseudomonádové pneumonie-infekce dýchacího ústrojí při cystické fibróze, osteomyelitida-záněty kostí popřípadě kostní dřeně, otitis media-zánět středního ucha. (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, aj), prostatitida (*Escherichia coli*) a další.²⁷ Infekce chlopenních náhrad (způsobené kmeny *S. aureus*) patří mezi nejzávažnější, úmrtnost spojená s touto infekcí se pohybuje okolo 25 %.^{22,28}

Kromě infekcí na syntetických površích mohou bakterie přisedat a růst na různých biologických površích a tím způsobovat infekce, konkrétním příkladem je onemocnění otitis media



Obrázek 6 Významné infekce, vzniklé vlivem přítomnosti biofilmu, v humánní medicíně označené tučně. Ostatní jsou biofilmy přirozené pro lidský organismus (H.Šinkorová).

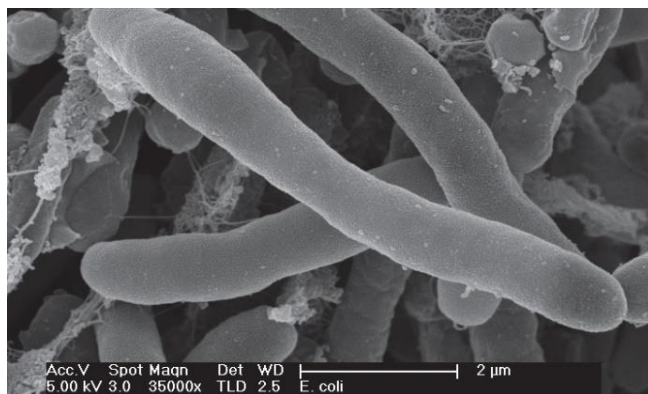
2.3.5. PATOGENNÍ BAKTERIÁLNÍ KMENY

Bakterie se řadí mezi prokariotní mikroorganismy, které jsou nejpočetnější na zemi nejen díky rychlé reprodukci, ale hlavně zásluhou dobré adaptace novému prostředí a rychlému vývoji. Prokariotické buňky mohou tvořit kolonie. Bakterie mají pouze tři možné struktury, mohou být kulové, okrouhlé nebo spirálovité. Hlavní rozdíl mezi eukaryotními a prokariotními buňkami spočívá v umístění dědičných informací DNA. Eukariotní buňka má jádro, které

obsahuje DNA, v prokariotní buňce je DNA obsaženo v cytoplazmě, která je ohraničena buněčnou stěnou. Z pohledu rozdílnosti buněčné stěny existují tři základní typy prokariotních buněk a to jsou: mycoplasmy, gramnegativní (G-) a grampozitivní (G+).

2.3.5.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) je zástupcem gramnegativních (G-) fakultativně anaerobních bakterií. Tato bakterie má tyčinkovitý tvar a bývá v průměru 2 μm dlouhá a 0,5 μm široká. *E. coli* spadá do čeledi *Enterobacteriaceae* kmene *Proteobacteria*. Bakterie *E. coli* je běžnou součástí střevní mikroflóry člověka. Podílí se na tvorbě vitamínů B₁₂ a K a chrání trávicí trakt před přemnožením jiných škodlivých bakterií. Pokud je obsažena ve vodě nebo potravinách dochází k fekálnímu znečištění.



Obrázek 7 *Escherichia coli*.²⁹

80 % případů střevních onemocnění vzniklých v zahraničí, způsobuje tato bakterie. U *E. coli* jsou známy 4 druhy kmenů, způsobujících střevní onemocnění.

- ❖ *Enteropatogenní E. coli* (EPEC) způsobuje průjmy novorozenců a kojenců, je největší hrozbou v rozvojových zemích.
- ❖ *Enterotoxigenní E. coli* (ETEC) se vyskytuje především v tropických oblastech, kde způsobuje cestovatelské průjmy.
- ❖ *Enteroinvazivní E. coli* (EIEC) proniká do buněk sliznice.
- ❖ *Enterohemoragická E. coli* (EHEC), je nejnebezpečnější druh tohoto bakteriálního kmene.

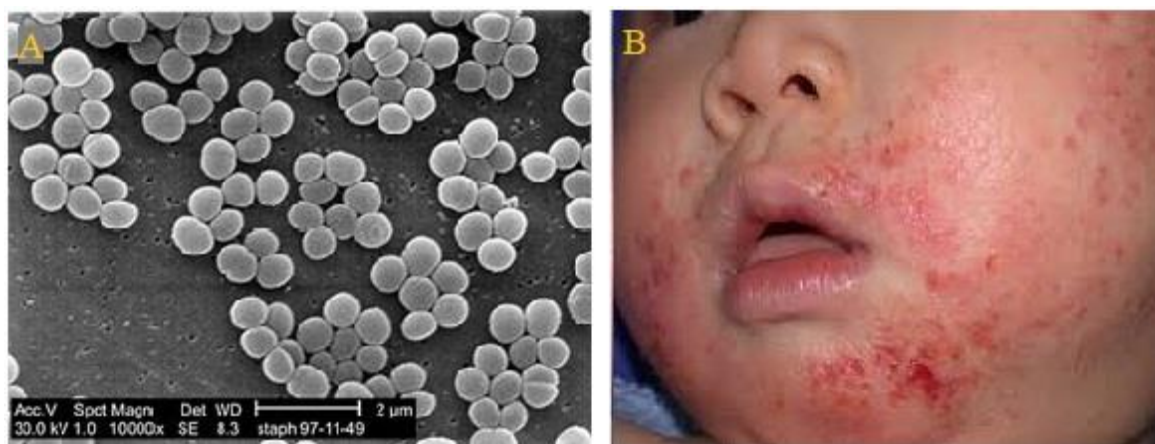
Pokud se bakterie *E. coli* nachází pouze na místech, která jsou pro ni typická (trávicí trakt) ve standardním množství, nezpůsobuje žádné zdravotní potíže. Nastane-li však situace, že se

přemnoží, dostane do jiných míst v lidském organismu, nebo se objeví některý ze čtyř výše uvedených druhů, může zapříčinit vznik infekcí, jako je peritonitida, která může být smrtelná, dále také meningitida, záněty močových a žlučových cest a jiné.

Kmen *E. coli* je ze všech bakterií nejlépe prozkoumán, tudíž se často označuje a používá jako modelový. Další výhodou použití (testování) této bakterie jsou onemocnění, které způsobuje. Ta ve většině případů nejsou nikterak vážná a nenesou s sebou trvalejší následky.^{21,30}

2.3.5.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) též nazývaný zlatý stafylokok je na rozdíl od *E. coli* grampozitivní (G+) fakultativně anaerobní bakterie. *S. aureus* má kulovitý tvar (kok), vyskytuje se ve shlucích zaujímající tvar hroznů (stafylokok), je nepohyblivý a netvoří spory. Tato bakterie je z čeledi *Staphylococcaceae* kmene *Firmicutes*. Velmi často se nachází v lidském organismu (20 % až 60 % lidské populace je jeho přenašečem), ale jeho kolonizace nevedou ke vzniku příznaků nemoci.

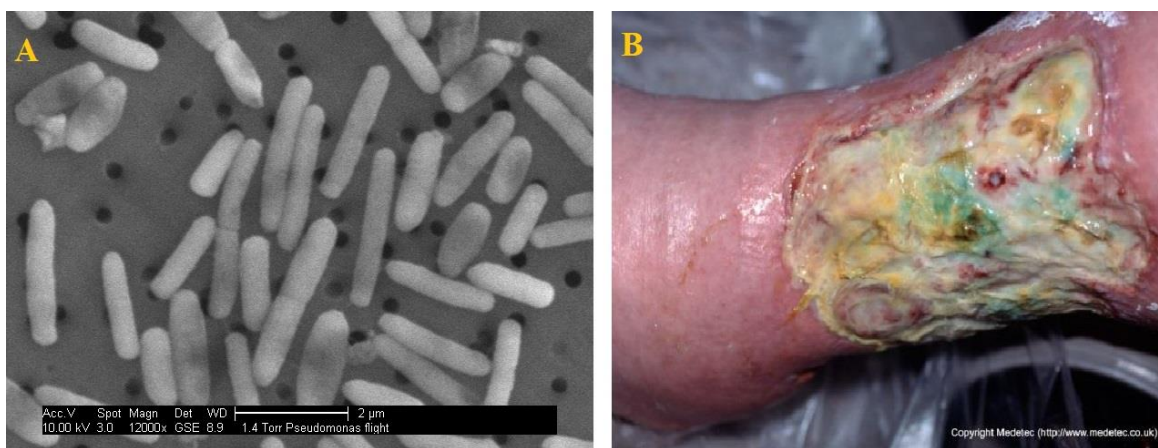


Obrázek 8 (A) *Staphylococcus aureus*.³¹ (B) Infekce kůže způsobená bakterií *Staphylococcus aureus*.³²

S. aureus způsobuje závažné problémy hlavně u pacientů s diabetem, pooperačními ranami, nebo s katétrem a řadí se tím mezi nejčastější bakterie způsobující nozokomiální infekce (infekce, která propukne za více než 48 hodin po přijetí do nemocnice). Výsledkem této infekce může být v lepším případě hnisavý zánět, v opačném případě např. tzv. syndrom kritického šoku, kdy může nastat i smrt. *S. aureus* se vyskytuje také v rezistentnější formě zvané MRSA (*methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus*). Infekce způsobené MRSA jsou v současné době považovány za hlavní hrozbu tohoto bakteriálního kmene. MRSA postihuje zejména dlouhodobě hospitalizované pacienty, byly však již pozorovány případy nákazy, která vypukla mezi sportovci, či ve školce. K přenosu infekce dochází kontaktem.^{33,34}

2.3.5.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Druhým zástupcem gramnegativních (G-) bakterií je bakteriální kmen *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), který je na rozdíl od *E. coli* aerobní bakterií. Tato bakterie má tyčinkovitý tvar a také jeden polární bičík. Vytváří žlutozelený fluorescein a modrozelený pigment podle čehož ji zařazujeme do tzv. fluorescenčních pseudomonás. Běžným působištěm *P. aeruginosa* jsou rostlinné produkty, odpadní voda a půda. Může se ale vyskytovat i v teplých vířivkách a bazénech.



Obrázek 9 (A) *Pseudomonas aeruginosa*.³⁵ (B) Infekce nohy způsobená *P. aeruginosa*, která zapříčiňuje zelené zbarvení.³⁶

P. aeruginosa je poměrně rezistentní bakterie. Je odolná vůči mýdlům a jiným běžným, čistícím prostředkům, kromě toho může růst i při teplotách 42 °C. Proto musíme počítat s tím, že je možné ji nalézt i na dezinfikovaném nádobí a nástrojích.

I tato bakterie patří mezi ty, jež jsou častou příčinou vzniku nozokomiálních infekcí. Tak jako již zmíněné bakterie i ona tvoří biofilm, který ji poskytuje ještě větší ochranu před imunitním systémem, antibiotiky a jinými antimikrobiálními přípravky. *P. aeruginosa* může způsobovat vyrážky, záněty středního ucha, močových cest, mimo jiné i lokální infekce u popálenin a bércových vředů.

3. POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ METODY

3.1. INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ

Při měření infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FTIR), dochází k průchodu infračerveného záření (IR) molekulami vzorku a následné absorpci tohoto záření. Tato metoda funguje na principu, že záření o vlnové délce označované λ , které odpovídá vlnové energii přechodů hladin, vyvolá charakteristické změny rotačně vibračních energetických stavů molekuly, kdežto záření o jiné vlnové délce projde látkou bez vyvolání změn. V pevných látkách a v kapalinách rotační přechody splývají, tudíž jsou využívány hlavně pro vzorky v plynném skupenství. O kvantitativním složení zkoumaného vzorku vypovídá intenzita lokálních maxim a kvalitativní složení určují hodnoty naměřeného spektra.³⁷

Při tomto měření jsou nejčastěji využívána záření o vlnové délce 1 až 1000 nm. Častěji se na místo vlnové délky v nm uvádí vlnčet označovaný písmenem k v cm^{-1} . Převod mezi těmito dvěma veličinami je zachycen ve vztahu (1).

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (1)$$

3.2. KONTAKTNÍ ÚHEL VODY

Metoda měření kontaktního úhlu se může na první pohled jevit jako velmi jednoduchá, avšak roli zde hraje velké množství faktorů, které z měření dělají složitou věc. Velice důležitou roli hraje správně připravený povrch zkoumaného předmětu, použití čisté kapaliny bez příměsí a včetně možnosti odpařování kapky. Pokud není vše dodrženo, můžeme měřením získat zkreslené a prakticky nepoužitelné údaje.

Metod měření kontaktního úhlu je mnoho, používaných metod jen pár. Základní dělení těchto metod je na dva okruhy. Prvním jsou metody, kdy se měří přímo statický kontaktní úhel kapky na rovném podkladu za pomoci videokamery, nebo goniometru. Druhým okruhem jsou metody nepřímé, zde dochází k měření dynamického kontaktního úhlu pomocí napětí (to zahrnuje měření sil interakcí).

Výpočet kontaktního úhlu pro tuto práci byl proveden dvěma způsoby. U prvního byla pro analyzování přisedlé kapky použita metoda $\theta/2$ za předpokladu, že kapalina zaujímal tvar koule.

$$\tan \frac{\theta}{2} = \frac{h}{x} \quad (2)$$

θ v rovnici (2) označuje statický kontaktní úhel, h symbolizuje výšku kapky a x označuje polovinu šířky dané kapky.

U druhého způsobu byla pro tuto práci použita jedna z přímých metod, konkrétně metoda měření úhlu smáčení na přisedlé kapce. Při tomto druhu měření jsou kontaktní úhly měřeny z profilu kapky. Velikost kontaktního úhlu je určena pouze tečnou přisedlé kapky v místě kontaktu kapky s pevným povrchem. Vyhodnocování probíhá pomocí videokamery a počítače. Nevýhodou tohoto měření je subjektivnost, která velice závisí na přesnosti měření, zručnosti a zkušenostech obsluhy.

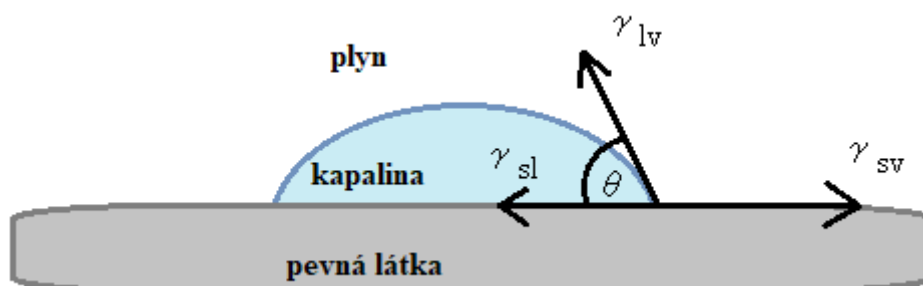
3.3. VOLNÁ POVRCHOVÁ ENERGIE

Stejně jako u kontaktního úhlu, lze měřit i volnou povrchovou energii různými metodami. Přímé měření FSE bývá velice komplikované, proto se využívá spíše nepřímých metod, kterých v dnešní době existuje velké množství. Většina z nich pro výpočet FSE používá znalosti z měření kontaktního úhlu.

Roku 1805 Thomas Young popsal rovnováhu sil na rozhraní tří fází rovnicí (3). Tato rovnice se nazývá Youngova rovnice a její grafické znázornění zachycuje obrázek 10.

$$\gamma_{sv} - \gamma_{sl} = \gamma_{lv} \cdot \cos \theta \quad (3)$$

V Youngově rovnici má γ_{sv} význam volné povrchové energie mezi pevnou a plynou fází, γ_{sl} je volná mezifázová energie rozhraní pevné látky a kapaliny, γ_{lv} je volná mezifázová energie rozhraní kapaliny a plynu a θ označuje kontaktní úhel při kontaktu kapaliny s pevnou látkou. Indexy u výše uvedených veličin jsou odvozeny z anglických názvů fází (l-liquid, s-solid, v-vapour).



Obrázek 10 Grafické znázornění Youngovy rovnice (H.Šinkorová).

Námi použité metody Kwok-Neumann a Li-Neumann jsou založeny na předpokladu, že existuje stavová rovnice $\gamma_{sl} = f(\gamma_{lv}, \gamma_{sv})$. Pokud tyto stavové rovnice zkombinujeme s Youngovou rovnicí, můžeme ze znalosti kontaktního úhlu θ a volné povrchové energie námi použité kapaliny γ_{lv} , vypočítat volnou povrchovou energii pevné látky γ_{sv} .

Li a Neumann navrhli stavovou rovnici ve tvaru³⁸:

$$\gamma_{sl} = \gamma_{lv} + \gamma_{sv} - 2\sqrt{\gamma_{lv}\gamma_{sv}}e^{-0,0001247(\gamma_{lv}-\gamma_{sv})^2} \quad (4)$$

Kombinací Li-Neumann stavové rovnice (4) a Youngovy rovnice (3) získáváme:

$$\cos \theta = -1 + 2\sqrt{\frac{\gamma_{sv}}{\gamma_{lv}}}e^{-0,0001247(\gamma_{lv}-\gamma_{sv})^2} \quad (5)$$

Kwok a Neumann navrhli tvar stavové rovnice³⁸:

$$\gamma_{sl} = \gamma_{lv} + \gamma_{sv} - 2\sqrt{\gamma_{lv}\gamma_{sv}}(1 - 0,0001057(\gamma_{lv} - \gamma_{sv})^2) \quad (6)$$

Kombinací Kwok-Neumann stavové rovnice (6) a Youngovy rovnice (3) získáváme:

$$\cos \theta = -1 + 2\sqrt{\frac{\gamma_{sv}}{\gamma_{lv}}}(1 - 0,0001057(\gamma_{lv} - \gamma_{sv})^2) \quad (7)$$

Poslední námi použitá metoda je Equation of state (EOS). Tato metoda je vhodná pro určování volné povrchové energie pomocí jedné kapaliny a bez ohledu na to, která kapalina byla vybrána, by měla být výsledná FSE stejná. Existuje několik málo různých verzí této rovnice, nejznámější je popisována Neumannem³⁹:

$$\cos \theta = -1 + 2\sqrt{\frac{\gamma_{sv}}{\gamma_{lv}}}e^{-0,0001247(\gamma_{lv}-\gamma_{sv})^2} \quad (8)$$

Jelikož se vychází z měření kontaktního úhlu, bude i FSE podléhat stejným faktorům ovlivňujícím měření.

3.4. MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL

Mikroskopie atomárních sil (AFM) spadá do kategorie nedestruktivních metod. K měření využívá skenující sondy, která pracuje v oblasti tzv. blízkého pole. Je schopna zobrazit strukturu povrchu na atomární úrovni a analyzovat částice o velikosti až 0,25 nm. Na hrot (cantilever) je nasměrován laserový paprsek jeho odchýlením lze určit velikost přitažlivých, nebo odpudivých sil. Velikou výhodou AFM je možnost sestrojení trojrozměrného obrazu,

naopak nevýhodou je velká citlivost na okolní vibrace, které zkreslují výsledky měření.

Metoda AFM nabízí dva základní režimy měření. Prvním z nich je kontaktní mód, kdy hrot (cantilever) je od povrchu vzdálen méně než několik desetin nm. Uplatňuje se zde odpuzivá síla mezi atomy hrotu a povrchu. Druhý režim, který poskytuje AFM se nazývá bezkontaktní mód. Hrot kmitá jednotky až desítky nm nad povrchem a detekuje se změna kmitu při uplatnění přitažlivé síly mezi hrotem a atomy povrchu.⁴⁰

3.5. SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) pro tvorbu obrazu využívá pohybující se svazek elektronů. Po dopadu elektronu na vzorek vzniká několik různých druhů signálů (prošlé, zpětně odražené, sekundární, Augerovy elektrony, rentgenové záření). SEM využívá k vytvoření obrazu zpětně odražené elektrony BSE a sekundární elektrony SE. Zdrojem svazku elektronu může být autoemisní, nebo žhavená katoda. Nevýhodou SEM je nutnost vodivého vzorku, toho lze dosáhnout naprašováním tenké vodivé vrstvy

Podle detekce SE nebo BSE elektronů rozlišujeme u SEM dva typy kontrastu. Prvním z nich je topografický kontrast, který vzniká čtením signálů SE. Druhý chemický kontrast vzniká detekcí BSE. Intenzita je závislá na protonovém čísle daného prvku.

SEM lze kombinovat s detektorem rentgenového záření, tím vzniká energiově disperzní analyzátor (EDS), který nám dává informaci o chemickém složení testovaného vzorku. Výstupem EDS je spektrum vypovídající o poměrech koncentrací daných prvků.

Pro biologické aplikace, kdy je potřeba testovat vlhké a elektricky nevodivé vzorky, se využívá environmentální rastrovací elektronová mikroskopie (ESEM). Při uchycení biofilmu na vodivý podklad lze využít skenovací elektronovou mikroskopii SEM, která poskytuje kvalitativní informace o biofilmu ve vysokém rozlišení. Vysoké rozlišení elektronového mikroskopu poskytuje informace o velikosti a tvaru buněk a lze pozorovat, zda se mikroorganismy usazují spíše v morfologicky nerovných oblastech.^{41–43}

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této kapitole se budeme zabývat konkrétními postupy, které byly prováděny při modifikaci PET fólií a následně i při jejich testování.

4.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

PET fólie o šířce 150 μm byly dodány společností TENOLAN® (IA 0001), Fatra, a.s. Grignardova činidla – methylmagnesiumbromid (3 M CH_3MgBr), butylmagnesiumchlorid (2 M $\text{C}_4\text{H}_9\text{MgCl}$), oktylmagnesiumbromid (2 M $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{MgBr}$), dodecylmagnesiumbromid (1 M $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{MgCl}$) v diethyletheru (DEE) a oktadecylmagnesiumchlorid (0,5M $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{MgCl}$) v tetrahydrofuranu (THF) byly dodány Sigma-Aldrich Co., CZ. Diethylether (99,7 %), metanol (99,9 %), hexan (99,5 %) aceton a koncentrovaná kyselina chlorovodíková (35 %) byli dodány firmou PENTA s.r.o., CZ. S výjimkou DEE, který bylo nutné vysušit, byly všechny chemikálie použity v dodaném stavu. Pro uchování sušeného DEE byla použita 4 Å molekulová síta o průměru 3,2 mm od firmy Sigma-Aldrich, Co., CZ. Jako kultivační medium pro buňky bylo použito Dubleccovo modifikované Eaglovo médium (DMEM) s vysokým podílem glukózy taktéž od firmy Sigma-Aldrich Co., CZ v kombinaci s fetálním bovinním sérem (FBS) od firmy Biosera Ltd. a telecím sérem (NBCS) dodaným firmou Gibco®.

Jak již bylo zmíněno výše, diethylether bylo potřeba před použitím vysušit. 500 ml DEE bylo destilováno 3 hodiny za přítomnosti 12 g kovového sodíku. Destilace byla prováděna pod inertní atmosférou argonu.

4.2. MODIFIKACE POVRCHŮ

4.2.1. PŘÍPRAVA

PET fólie byla rozstříhána na dva typy vzorků (čtverce o rozměrech 2x2 cm a 5x5 cm). Před modifikací musely být PET fólie důkladně omyty. Pro fólie rozměru 5x5 cm: fólie byly po dvou vkládány do 250ml Erlenmeyerových baněk a k nim bylo přidáno 100 ml acetonu. Následně byly Erlenmeyerovy baňky s fóliemi vloženy na 1 min do sonikační lázně. Tento proces se prováděl celkem 3x po dobu 1 minuty v acetonu a následně se promývalo 3x po dobu 1 minuty v hexanu. Pro fólie rozměru 2x2 cm byl postup totožný, ale na místo po dvou byly do Erlemeyerových baněk vkládány po pěti. Čištění fólií probíhalo za pokojové teploty při 20 °C. Po vyčištění byly fólie sušeny ve vakuu v exsikátoru.

4.2.2. FUNKCIONALIZACE

Do 250ml dvou nebo tříhrdlé baňky byla vložena PET fólie o velikosti 5x5 cm. Následně byla baňka připevněna k vakuově-inertní lince. Do baňky bylo přidáno 50 ml 0,1 M Grignardova činidla rozpuštěného v DEE, přesný popis objemů Grignardova činidla a DEE tvořící 0,1 M roztok popisuje tabulka 2. Za stálého míchání byly roztoky ponechány 30 min, 1 hod, 2 hod a 3 hod. Poté byly PET fólie z roztoků vytaženy a následně byl proveden oplach. Fólie byly přendány do 250ml Erlenmayerovy baňky a k nim bylo přidáno 50 ml DEE, baňka byla vložena na 1 min do sonikační lázně. Opakováno se stejným množstvím CH_3OH , 0,01 M HCl a 3x s destilovanou vodou. Po finálním čištění byly fólie sušeny ve vakuu v exsikátoru.

Tabulka 2 Přesný popis přípravy 50 ml 0,1 M roztoku testovaných Grignardových činidel.

Příprava 50 ml 0,1 M roztoku Grignardova činidla		Grignardovo činidlo [ml]	Diethylether [ml]
3 M	CH_3MgBr	1,7	48,3
2 M	$\text{C}_4\text{H}_9\text{MgCl}$	2,5	47,5
2 M	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{MgBr}$	2,5	47,5
1 M	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{MgBr}$	5	45
0,5 M	$\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{MgCl}$	10	40

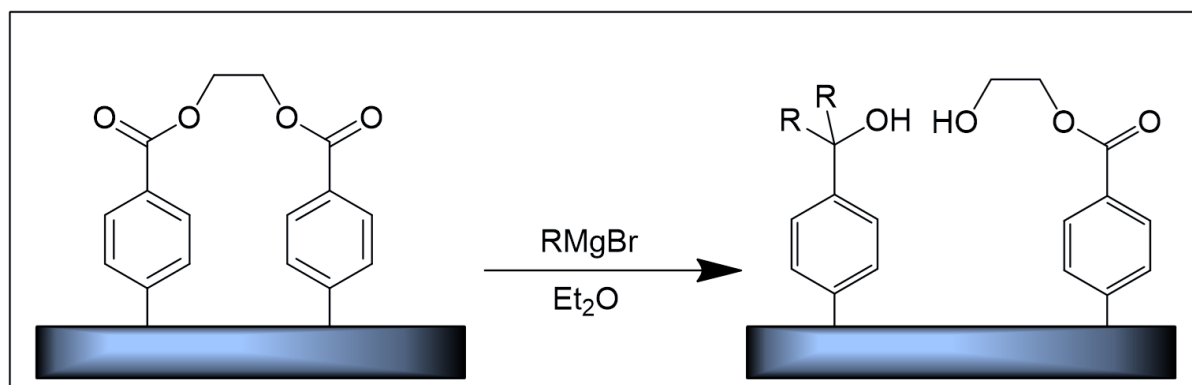


Schéma 4 Modifikace PET fólií pomocí Grignardových činidel.

4.2. TESTOVÁNÍ VLASTNOSTÍ POVRCHŮ PŘIPRAVENÝCH VZORKŮ

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

K měření byl použit spektrometr FTIR iZ10 (ThermoFischer Scientific, USA), ATR (metoda totálně zeslabené reflexe) a krystal z Ge pod úhlem 45°. Pro měření byl použit spektrální rozsah 4000-700 cm⁻¹. Na měření byla aplikována korekce potlačení atmosféry.

Kontaktní úhel vody

Pro měření kontaktního úhlu vody byly použity dva různé přístroje. První z nich je přenosný počítačový přístroj s příslušným softwarem, který splňuje normu ISO 27448:2009. Měření bylo prováděno na 20 kapkách o objemu 3,5 µl. U tohoto měření bylo nutné vytvářet kapku ručně pomocí automatické pipety o objemu 10 µl, tím se zde vyskytuje větší míra nepřesností způsobená např. jinými úhly, pod kterými byly kapky na vzorek nanášeny. Pro měření na tomto přístroji byla použita metoda $\theta/2$.

Jako druhý přístroj byl použit Drop Shape Analyzer - DSA30 od firmy KRÜSS a k analyzování kontaktního úhlu kapky byl použit software Drop Shape Analysis 4. Stejně jako u prvního přístroje bylo prováděno měření na 20 kapkách, tentokrát o objemu 10 µl. Výhoda tohoto přístroje spočívá v automatickém dávkování kapek, čímž se zamezí vzniku zbytečných chyb. Pro vyhodnocení kontaktního úhlu byla použita metoda měření úhlu smáčení na přisedlé kapce.



Obrázek 11 Přístroj Drop Shape Analyzer – DSA30 určený k měření kontaktního úhlu.⁴⁴

Volná povrchová energie

Volná povrchová energie byla vyhodnocována nepřímými metodami z výše naměřených kontaktních úhlů. Samotné vyhodnocování bylo automaticky prováděno pomocí speciálních softwarů jmenovaných výše v kapitole 4.2 a odstavci kontaktní úhel vody. Pro výpočet FSE byly zvoleny tři různé metody, vycházející ze znalosti kontaktního úhlu. Byly to Kwok-Neumann metoda, Li-Neumann metoda a Equation of state.

Mikroskopie atomárních sil

K měření topografie PET fólií byl použit AFM mikroskop od JPK Instruments NanoWizard III a cantilever NANOSENSORSTM PPP-CONTSCR. Rezonanční frekvence byla nastavena na 23 kHz a přitlačná síla na 0,2 N/ m². Pro měření byl vybrán (z důvodu lepší přesnosti) kontaktní režim. Změnu drsnosti jsme pozorovali při rozměrech 1x1 μm a 10x10 μm.

Rastrovací elektronová mikroskopie

Povrchová morfologie a její změny byly pozorovány pomocí rastrovací elektronové mikroskopie SEM - ZEISS od firmy Sigma family (Německo). Pro zajištění vodivosti PET fólií, byla na vzorky nanесena vrstva zlata o tloušťce jednotek nm.

Antibakteriální testy zaměřené na biofilm

Pro tyto testy byly vybrány 3 patogenní bakteriální kmeny, z toho dva zástupci G- bakterií *Escherichia coli* (CCM 3954) a *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955) a jeden zástupce G+ bakterií *Staphylococcus aureus* (CCM 3953). Každý bakteriální kmen byl nasazen na rovný povrch a ponechán 24 hodin v inkubaci při 37 °C. Bakteriální kmeny byly odebírány pomocí plamenem opálené mikrobiologické kličky. Kličkou byl proveden stěr buněčné kultury, která byla následně krouživými pohyby roztírána o stěnu kádinky s fyziologickým roztokem. Po zpění byly bakterie přeneseny do živné půdy. Následně bylo provedeno měření koncentrace bakterií v roztoku. Tento postup byl opakován, dokud nebylo dosaženo dostatečného množství roztoku o požadované koncentraci.

Do 100 ml Fisherovy nádoby bylo odpipetováno 50 ml bakteriálního inokula o koncentraci 10⁸ CFU/ml, do takto připravených nádob byly vloženy PET fólie a celý systém byl ponechán k inkubaci při teplotě 37 °C. Roztoky s PET fóliemi byly každých 30 min po dobu prvních 5 hodin promíchávány. Po 24 hodinové inkubaci byly PET fólie z roztoku přendány do sterilních Fisherových nádob a zality 20 ml sterilního fyziologického roztoku. Z roztoku, ve

kterém se PET fólie 24 hodin inkubovaly, byly provedeny testy KTJ-CFU (kolonie tvořící jednotka). Následně byly nádoby s PET fóliemi dány na 60 min do třepačky při 300 rpm. Po třepání byl z každého vzorku odebrán 1 ml fyziologického roztoku a byly provedeny další testy KTJ. Z vytřepaných fólií byly vytvořeny otisky, které byly analyzovány pomocí fluorescenční mikroskopie a metody live-dead (označení a měření počtu živých a mrtvých bakterií).

Testování cytotoxicity

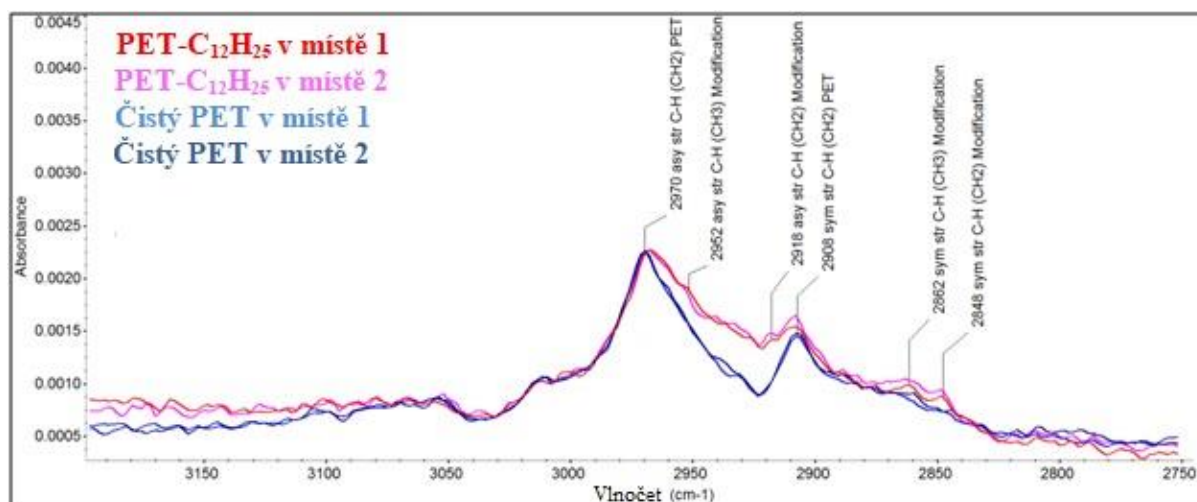
Testování cytotoxicity námi modifikovaných PET fólií probíhalo in vitro. Testy probíhaly na modelové buněčné linii myších fibroblastů 3T3 (klon A31). Před testováním bylo nutné modifikované PET fólie upravit. PET fólie byly znovu vyčištěny a sterilizovány pomocí UV záření po dobu 20 minut. Pro testování proliferace byly použity vzorky tvaru čtverce o délce strany 1 cm, pro testování adheze vzorky o délce strany čtverce 0,5 cm. Tyto PET fólie byly umístěny do sterilní kultivační 24-jamkové destičky a zafixovány sterilními inertními inserty. Pro každý časový úsek bylo měření prováděno v triplicátu.

Testování adheze buněk k povrchu bylo vyhodnocováno mikroskopicky 12 hodin po ukončení kultivace. Testované PET fólie byly opláchnuty a zbaveny tak buněk, které neadherovaly k povrchu. Dále byly fixovány, obarveny a zpracovány do mikroskopického preparátu. Barvení bylo provedeno pomocí fluorescenčních barviv. Na buněčná jádra byla použita barva propidium jodid (PI) a k obarvení buněčných membrán bylo použito barvivo 3,3-dihexyloxacarbocyanin jodid. Testované fólie byly snímány za použití mikroskopu Axiomager M2. Měření počtu adorovaných buněk bylo provedeno pomocí software ImageJ, kdy byla počítána viditelná buněčná jádra na snímcích pořízených při zvětšení 100x.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. VÝSLEDKY MĚŘENÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROSKOPIE

Měření pomocí FTIR spektroskopie bylo prováděno na více místech. Srovnání nemodifikované PET fólie s modifikovaným vzorkem PET-C₁₂H₂₅ (obrázek 12) ukazuje na zřetelný nárůst vibračních pásů u modifikovaného vzorku. Také lze ze spektra vyčíst, že modifikace povrchu je rovnoměrně rozložena. Zdvojený pás o slabé intenzitě a kmitočtu v rozmezí 2980 – 2850 cm⁻¹ signalizuje výskyt C-H vazeb přítomných v alkanech. Na spektru jsou viditelné píky popisující čistou PET fólii a označující asymetrickou vibraci vazeb C-H vyskytující se vedle skupiny CH₂ při 2970 cm⁻¹ a symetrickou vibraci vazeb C-H vedle skupiny CH₂ při 2908 cm⁻¹. Modifikovaný vzorek popisují píky označující asymetrickou vibraci vazeb C-H nacházejících se vedle skupiny CH₃ při 2952 cm⁻¹, asymetrickou vibraci vazeb C-H vedle skupiny CH₂ při 2918 cm⁻¹, symetrickou vibraci vazby C-H vazeb vedle CH₃ při 2862 cm⁻¹ a symetrickou vibraci vazeb C-H sousedících se skupinou CH₂ při 2848 cm⁻¹.

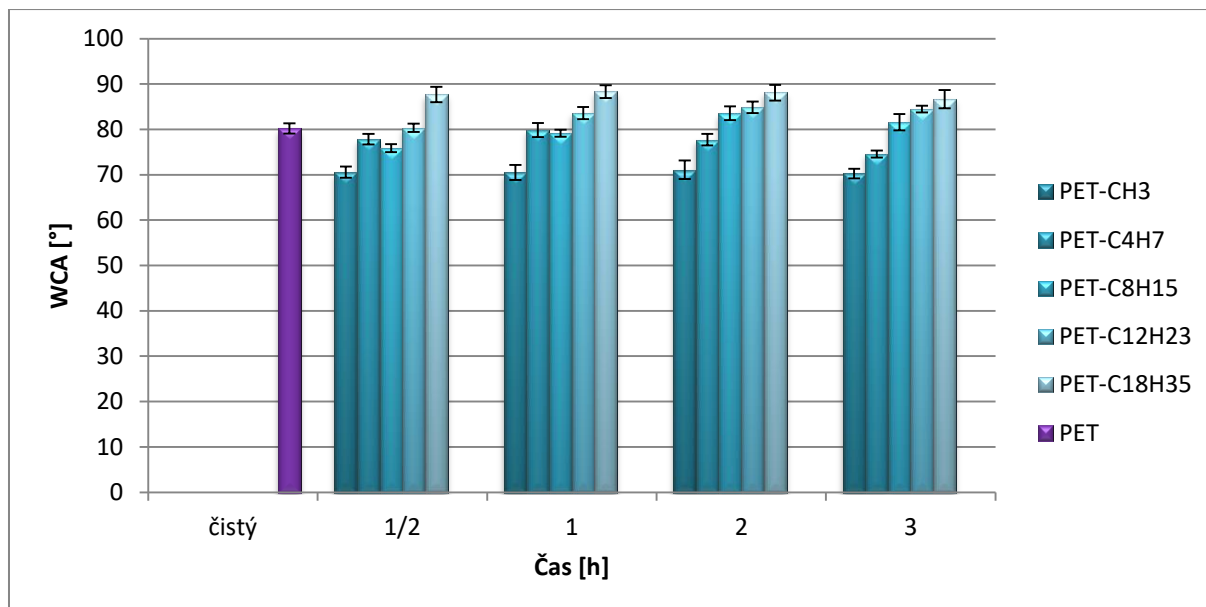


Obrázek 12 FTIR spektrum porovnávající nemodifikovanou PET fólii a vzorek PET-C₁₂H₂₅.⁴⁵

Při testování metodou FTIR byly na PET vzorcích identifikovány stopy stearylamiidu, který je s největší pravděpodobností kontaminoval během skladování v PE sáčcích. Po tomto zjištění byly všechny vzorky omyty acetonem a následně ethanolem, přeměřeny FTIR a uskladněny ve skleněných dózách. Námi zvolená metoda není pro charakterizování takto modifikovaných povrchů příliš vhodná, proto byla zkoušena také Ramanova spektroskopie, bohužel neúspěšně a metoda SEM-EDS viz kapitola 5.4. Pro další práci máme v plánu testovat metodu rentgenové elektronové spektroskopie (XPS), jenž by nám měla umožnit detailnější analýzu pouze vazeb vzniklých na povrchu modifikovaných vzorků.

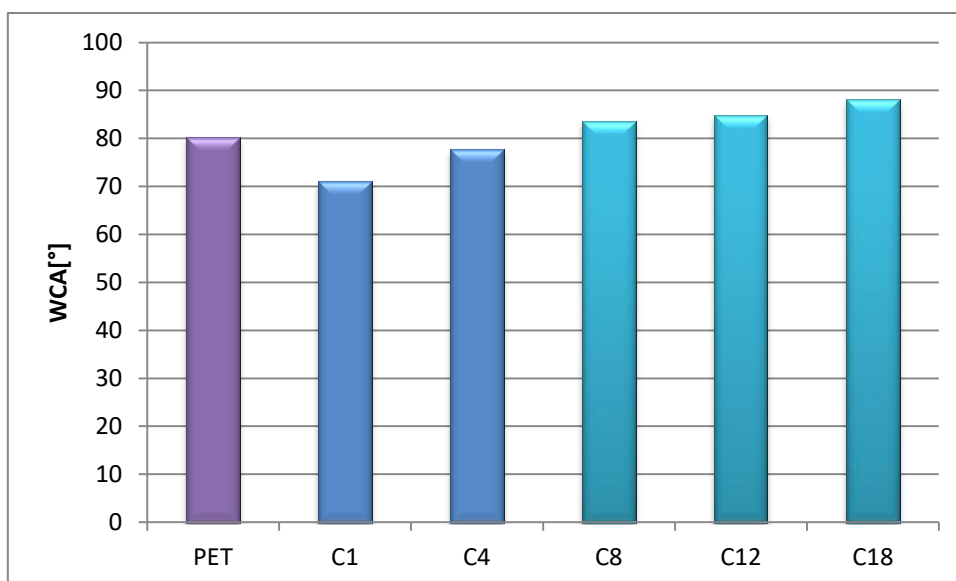
5.2. ANALÝZY MĚŘENÍ KONTAKTNÍHO ÚHLU

Hlavní fyzikální veličinou, na základě které se hodnotí adheze mikroorganismů k povrchům je hydrofobicita. Určení hydrofobicity lze provést více metodami avšak měření kontaktního úhlu je pro stanovení nejlepší. Proto je měření kontaktního úhlu pro tuto práci velmi důležité.



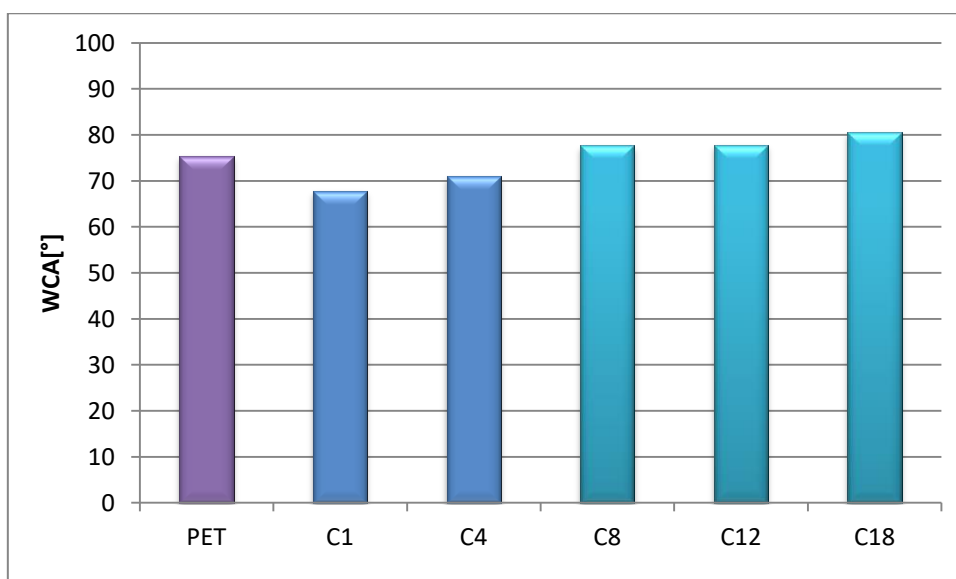
Obrázek 13 Grafické zpracování výsledků měření kontaktního úhlu vody (WCA) všech modifikovaných vzorků ve stanovených reakčních časech v porovnání s nemodifikovanou PET fólií.

První měření WCA se prováděla na všech typech modifikovaných vzorků a pro všechny reakční časy. Dohromady s nemodifikovanými PET fóliemi se dělalo 21 různých měření. Z výsledků těchto měření bylo zjištěno, že nejvyšších kontaktních úhlů dosahují PET fólie, které byly v reakci 2 hodiny. Díky tomuto zjištění byly pro následující testy použity modifikované PET fólie o délce reakčního času 2 hodiny.



Obrázek 14 Výsledek měření kontaktních úhlů modifikovaných PET fólií po 2 hodinové reakci v porovnání s nemodifikovanou PET fólií. Měřeno metodou $\theta/2$.

Jak lze vidět na obrázku 14 kontaktní úhly dvou modifikovaných vzorků PET-CH₃ a PET-C₄H₉ vyšly nižší než kontaktní úhel nemodifikovaného vzorku. Nemodifikovaná PET fólie dosahuje 80,2 °, nejnižší hodnota 71,1 ° byla naměřena pro modifikaci PET-CH₃ a nejvyšší 88,1 ° PET-C₁₈H₃₇. Z těchto hodnot byly vypočteny hodnoty FSE pomocí Kwok-Neumann a Li-Neumann metod.

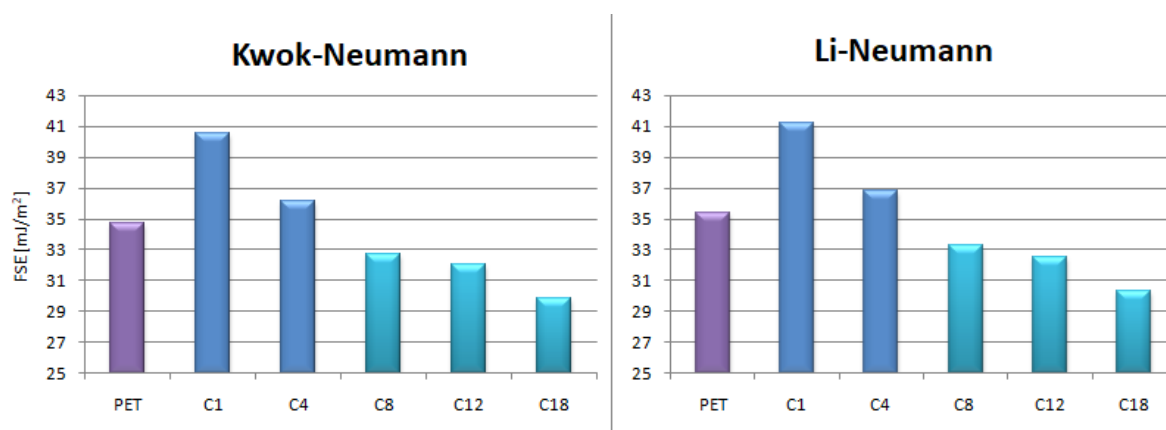


Obrázek 15 Kontaktní úhly modifikovaných PET fólií v porovnání s nemodifikovanou fólií. Metoda měření úhlu smáčení na přisedlé kapce.

Pokud porovnáme obrázek 15 s obrázkem 14, všimneme si, že trend zvyšujícího se

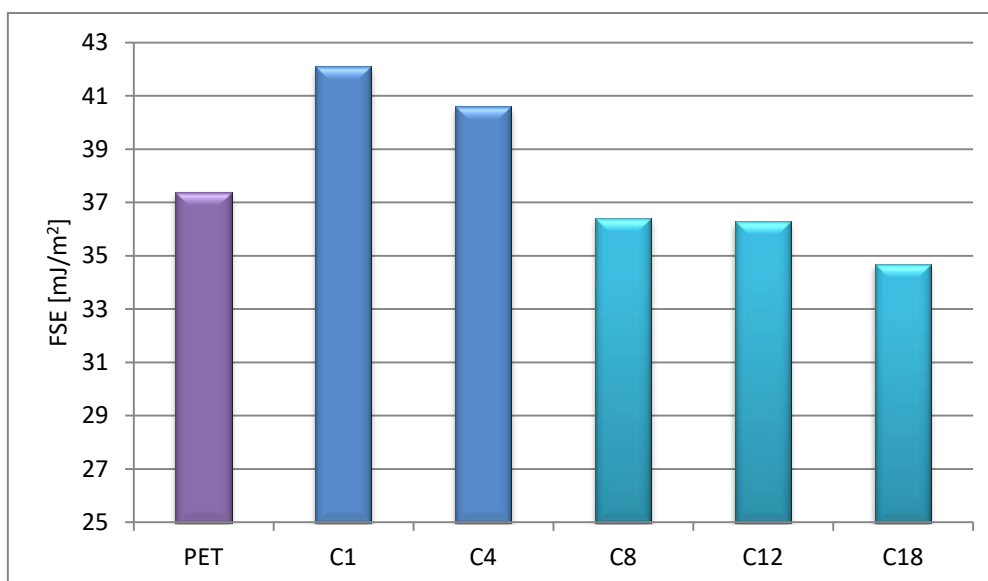
kontaktního úhlu s rostoucí délkou alkylového řetězce se zachoval. Také modifikované vzorky PET-CH₃ a PET-C₄H₉ mají nižší kontaktní úhel než nemodifikovaný vzorek stejně jako na obrázku 14. Hodnoty WCA získané metodou měření úhlu smáčení na přisedlé kapce však vycházejí o 5° až 8° nižší. Z těchto hodnot byly vypočteny hodnoty FSE metodou EOS.

5.3. ANALÝZY MĚŘENÍ VOLNÉ POVRCHOVÉ ENERGIE



Obrázek 16 Grafické zpracování výsledků volné povrchové energie pomocí Kwok-Neumann a Li-Neumann metod.

Uvedené hodnoty byly vypočítávány ze stejných hodnot kontaktního úhlu, můžeme tedy vidět, že vyšly téměř totožně (Kwok-Neumann metoda výpočtu poskytla hodnoty lehce nižší než Li-Neumann metoda). Dále budou rozebírány jen výsledky FSE pomocí Kwok-Neumann metody. FSE pro nemodifikovanou PET fólii dosahovala hodnot 34,7 mJ/m². Nejvyšší vypočtenou hodnotu FSE 40,6 mJ/m² jsme získali pro modifikovaný vzorek PET-CH₃ nejnižší 29,9 mJ/m² pro modifikace PET-C₁₈H₃₇.

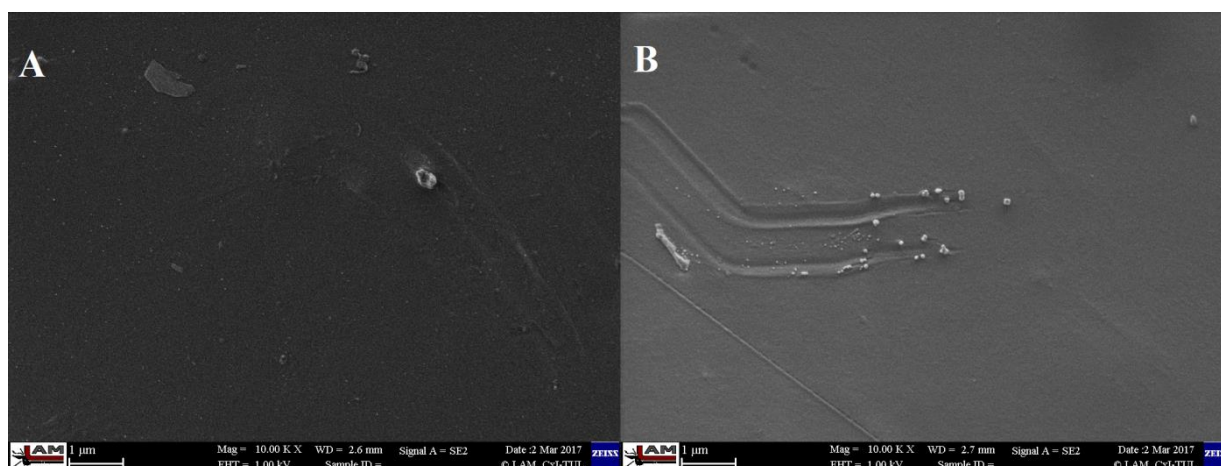


Obrázek 17 Volná povrchová energie vypočtená z naměřených hodnot kontaktních úhlů vody metodou EOS.

U hodnot získaných metodou EOS, pozorujeme stejný růstový trend jako u předchozích metod. Hodnoty FSE metodou EOS vycházejí o 3 až 5 mJ/m² vyšší.

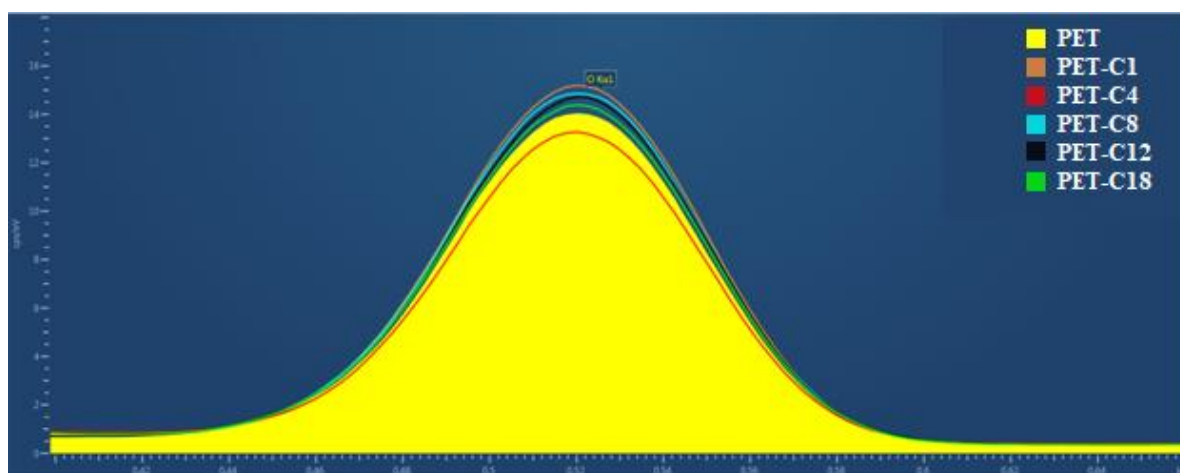
Vliv FSE na adhezi bakterií byl již v předchozích letech studován. Publikace uvádějí nejnížší adhezi bakterií kmene *E. coli* mezi hodnotami 21 a 29 mJ/m²⁴⁶. Hodnotě 29 mJ/m² jsme se velice přiblížili s modifikovaným vzorkem PET-C₁₈H₃₇, u kterého byla vypočtena hodnota 29,9 mJ/m² (34,6 mJ/m² pro metodu EOS). Nejnížší adheze bakteriálního kmene *P. aeruginosa* byla uvedena mezi 20 a 24 mJ/m²⁴⁶. K této hodnotě se nám nepodařilo přiblížit ani jednou modifikací. Námi získané výsledky adheze bakterií k povrchu jsou popsány v kapitole 5.6.

5.4. ZMĚNY MORFOLOGIE MODIFIKOVANÝCH VZORKŮ



Obrázek 18 SEM Snímky PET fólií (A) nemodifikovaná PET, (B) modifikace PET-C₈H₁₇.

Pomocí SEM byly pořízeny snímky nemodifikované PET fólie i všech modifikovaných PET fólií. Pro ukázkou byly vybrány dva snímky. Prvním z nich je nemodifikovaná PET fólie (A), jako druhý byla vybrána PET-C₈H₁₇ (B), na které lze identifikovat porušený povrch dvěma rýhami. Povlak vytvořený na modifikované PET fólii je viditelný, není dokonale viditelný na žádném z testovaných vzorků, vzhledem k faktu, že se pohybujeme na téměř molekulární úrovni, u AFM analýz však již změny identifikovatelné jsou viz kapitola 5.5. Předpokládáme, že různé modifikace PET fólií budou dosahovat různé tloušťky vrstvy. Navíc nepředpokládáme, že vrstva je zcela rovnoměrně rozložena, jinými slovy vrstva bude dosahovat rozdílné tloušťky na různých místech měření. Avšak tato metoda není průkazná, proto byla použita AFM mikroskopie.



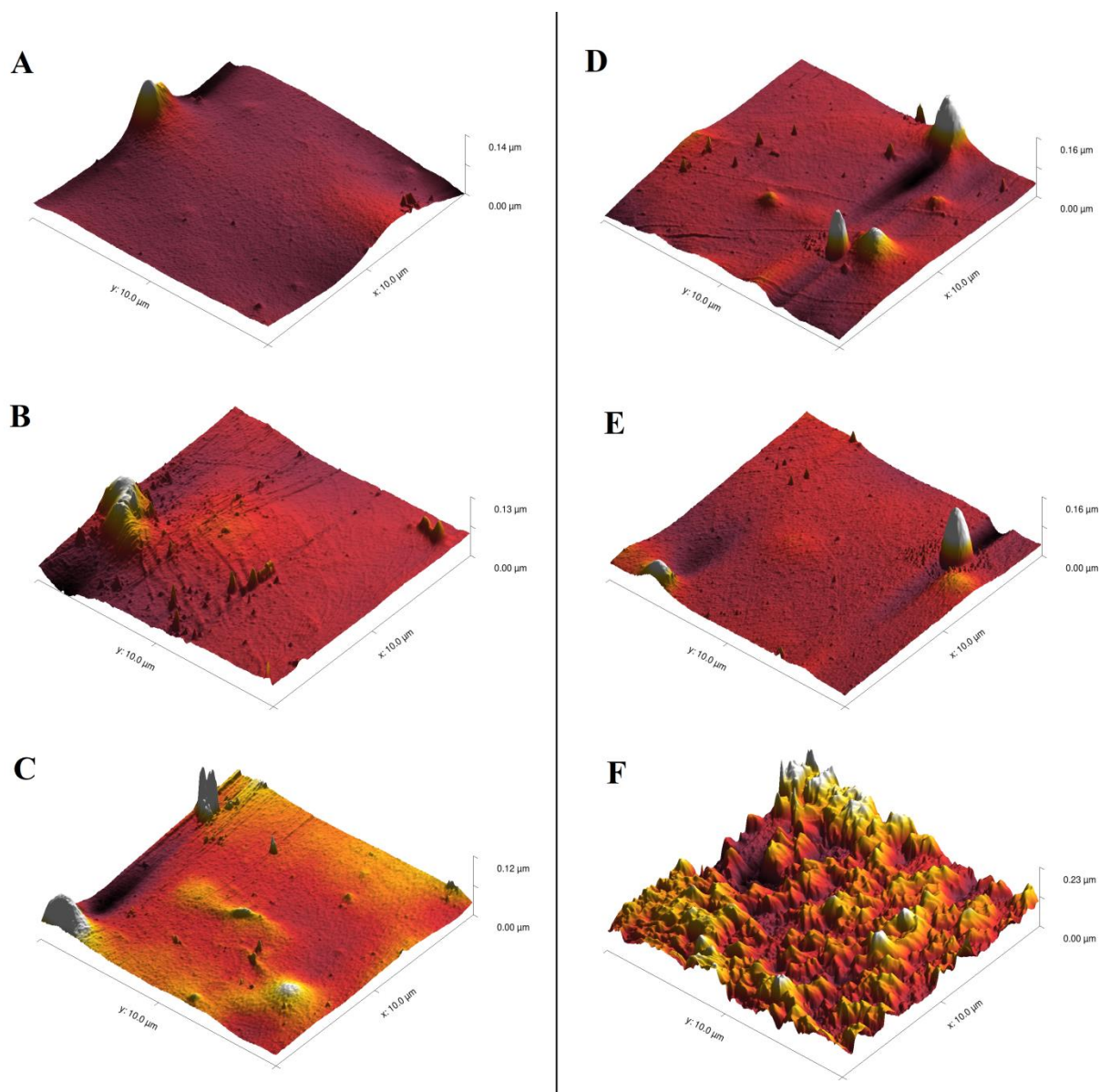
Obrázek 19 Hodnocení vrstev pomocí SEM-EDS.

Pomocí metody SEM-EDS jsme se snažili prokázat přítomnost -OH skupin na

modifikovaných PET fóliích. Bohužel i při nejmenším urychlovacím napětí elektronů jsme nebyli schopni změřit připravenou nanovrstvu, protože svazek elektronů prostoupil hlouběji do PET-fólie.

5.5. ZMĚNY DRSNOSTI MODIFIKOVANÝCH VZORKŮ

Pomocí AFM mikroskopie jsme pozorovali změny drsnosti (R_a) PET fólií jak číselně, tak graficky.



Obrázek 20 Změna topografie vzorků o rozměru 10x10 μm. (A) čistá PET fólie, (B) PET fólie po 2 h v DEE, (C) PET-CH₃, (D) Čistá PET fólie (E) PET fólie po 2 h v DEE, (F) PET-C₁₈H₃₇.

PET fólie (obrázek 20) v prvním řádku (A) a (D) jsou umyté a nemodifikované, pouze vyčištěné. Následně byly tyto vzorky ponořeny na 2 h do DEE obrázky (B) a (E), abychom mohli pozorovat, jak ovlivní topografii povrchu samotné rozpouštědlo (bobtnání fólie). V posledním kroku byla provedena modifikace. Pro ukázkou byla vybrána modifikace s nejkratším (C) a nejdelším (F) alkylovým řetězcem. Změny drsnosti zbylých modifikovaných vzorků jsou k dispozici v příloze 8.3. Při měření byla snaha pozorovat tento průběh na jednom místě. Můžeme si všimnout, že topografie u modifikace PET-CH₃ se oproti čistému vzorku změnila. Povrch byl pokryt povlakem. U modifikace PET-C₁₈H₃₇ je změna topografie o mnoho výraznější, pokrytí však není zcela rovnoměrné. Naměřené hodnoty všech modifikací jsou uvedeny v tabulce 3. Číselné hodnoty pro pozorování změny drsnosti povrchů při rozměru 1x1 μm uvádí tabulka 4, grafickou změnu pozorovanou na tomto rozměru zachycuje příloha 8.2.

Tabulka 3 Změna drsnosti povrchu (Ra)^a u všech modifikovaných PET fólií pro rozměr 10x10 μm.

Změny drsnosti povrchu pro rozměr 10x10 μm					
Druh modifikace:	PET-CH ₃	PET-C ₄ H ₉	PET-C ₈ H ₁₇	PET-C ₁₂ H ₂₅	PET-C ₁₈ H ₃₇
Čistý PET	4,57	4,52	8,35	6,69	4,53
2h v DEE	5,25	4,96	9,45	10,09	5,35
Modifikovaný	5,82	5,40	10,65	18,05	24,30
Hodnoty v tabulce jsou uvedeny v nm					

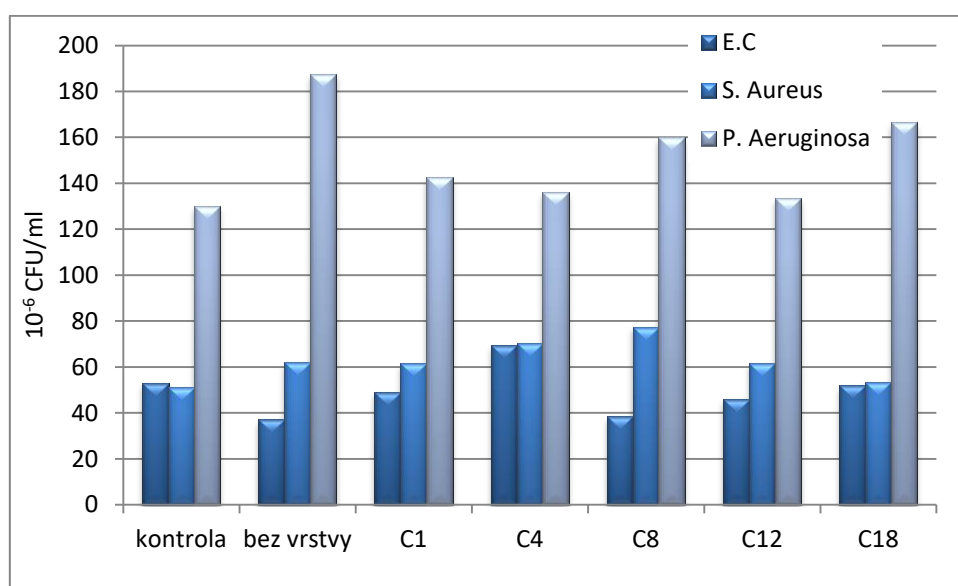
^aRa označuje střední aritmetickou odchylku povrchu v řezu.

Tabulka 4 Změna drsnosti povrchu (Ra)^a u všech modifikovaných PET fólií pro rozměr 1x1 μm.

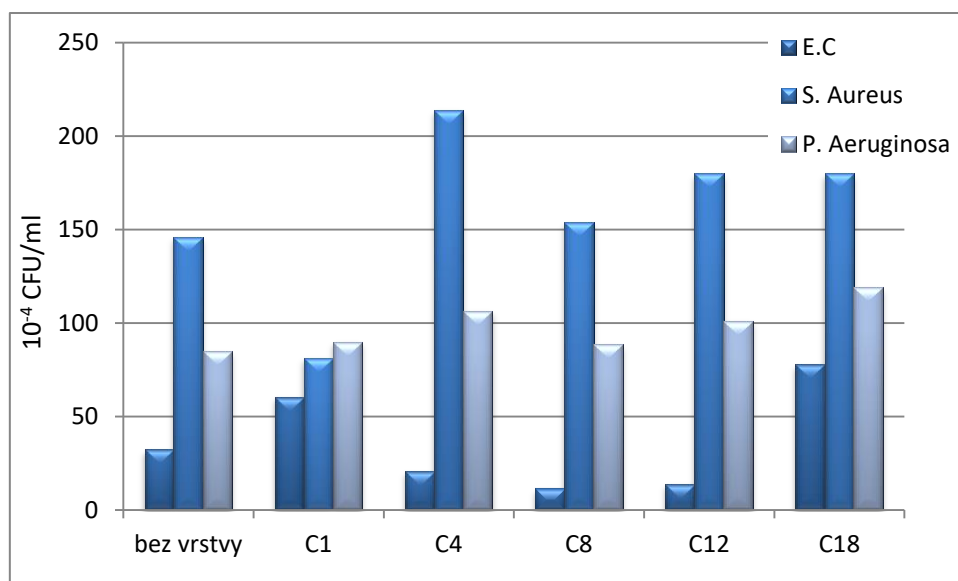
Změny drsnosti povrchu pro rozměr 1x1 μm					
Druh modifikace:	PET-CH ₃	PET-C ₄ H ₉	PET-C ₈ H ₁₇	PET-C ₁₂ H ₂₅	PET-C ₁₈ H ₃₇
Čistý PET	456	224	487	1170	423
2hod v DEE	1085	525	805	1530	616
Modifikovaný	2111	813	991	2270	10290
Hodnoty v tabulce jsou uvedeny v pm					

5.6. VÝSLEDKY TESTŮ BIOFILMU

Z roztoků, ve kterých byly PET fólie ponechány 24 hodin k inkubaci, byly provedeny první testy KTJ. Výsledky těchto testů zachycuje obrázek 21. Počáteční koncentrace všech bakteriálních kmenů byla stejná, tedy 10^8 CFU/ml. Lze tedy usoudit, že bakteriím *P. aeruginosa* se dařilo lépe, jinými slovy množily se rychleji než zbylé dva bakteriální kmeny. Oproti kontrolnímu testu došlo u bakteriálních kmenů *S. Aureus* a *P. aeruginosa* k nárůstu bakterií, kdežto u *E. coli* jsou hodnoty v některých případech vyšší a v některých zase naopak nižší. Z publikací týkajících se adheze *E.coli* k různým povrchům je zřejmé, že špatně adheruje na rovné, hladké povrchy, tím by mohl být tento jev způsoben.^{47,48}

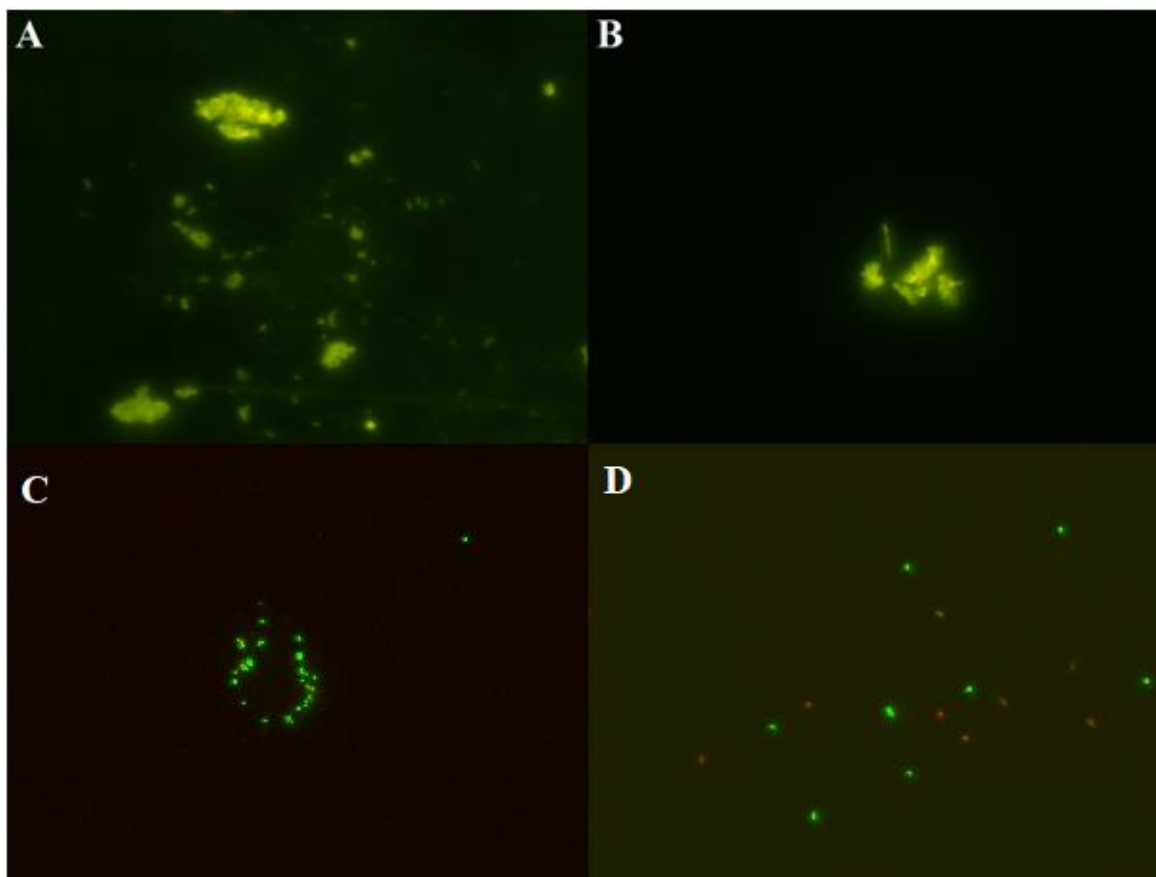


Obrázek 21 Grafické zpracování výsledků testů KTJ suspenze, ve které byly vzorky ponechány 24 hodin.



Obrázek 22 Výsledky testů KTJ z roztoku, do kterého byly vzorky 1 hodinu vytřepávány.

Další testy KTJ byly provedeny z roztoků do kterých byly po dobu jedné hodiny vzorky vytřepávány. Kdybychom porovnali obrázek 22 s obrázkem 21, zjistili bychom, že se *P. aeruginosa* množila více než jednou tolik oproti zbylým dvou bakteriálním kmenům. Na obrázku 22 lze vidět, že se do roztoku po třepání uvolnil větší počet bakterií *S. aureus*, což může souviset s jejich morfologií (koky bez bičků), složením buněčné membrány, metabolismem a dalšími faktory. Pro lepší charakterizaci chování bakterií na připravených PET-fóliích bylo navrženo testování kritické koncentrace (hraniční koncentrace, při které nedochází k množení bakterií). Avšak tyto testy nebyly dosud provedeny, ale jsou aktuálně plánovány.

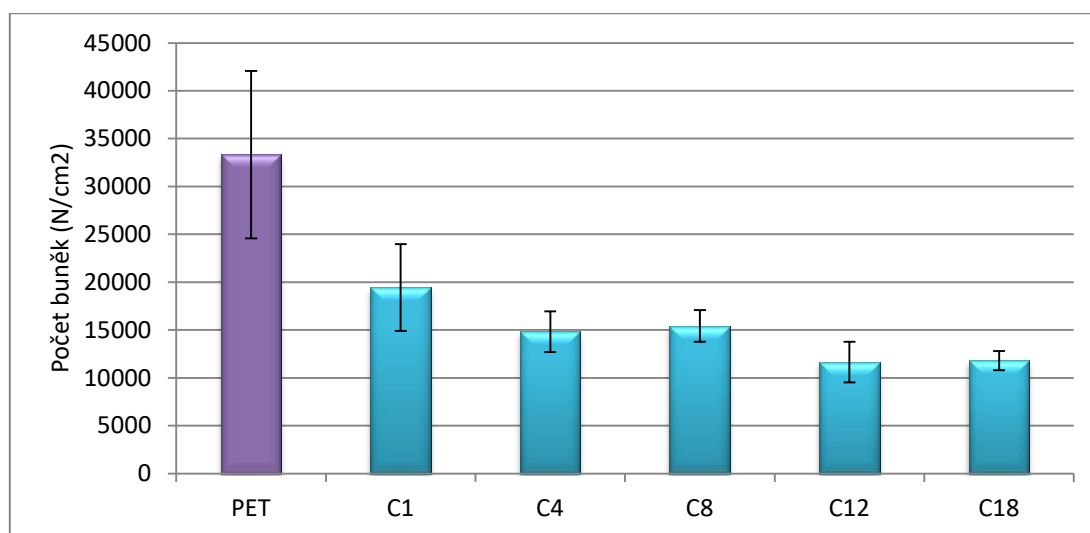


Obrázek 23 Snímky z fluorescenčního mikroskopu - metoda live-dead. Zeleně svítí žijící bakterie a červeně mrtvé. (A) nemodifikovaná PET fólie v kontaktu s *E. coli*, (B) modifikovaný vzorek PET-C₈H₁₇ v kontaktu s *E. coli* (C) modifikovaný vzorek PET-C₄H₉ v kontaktu s *S. aureus* (D) modifikovaný vzorek PET-C₁₈H₃₇ v kontaktu s *P. aeruginosa*.

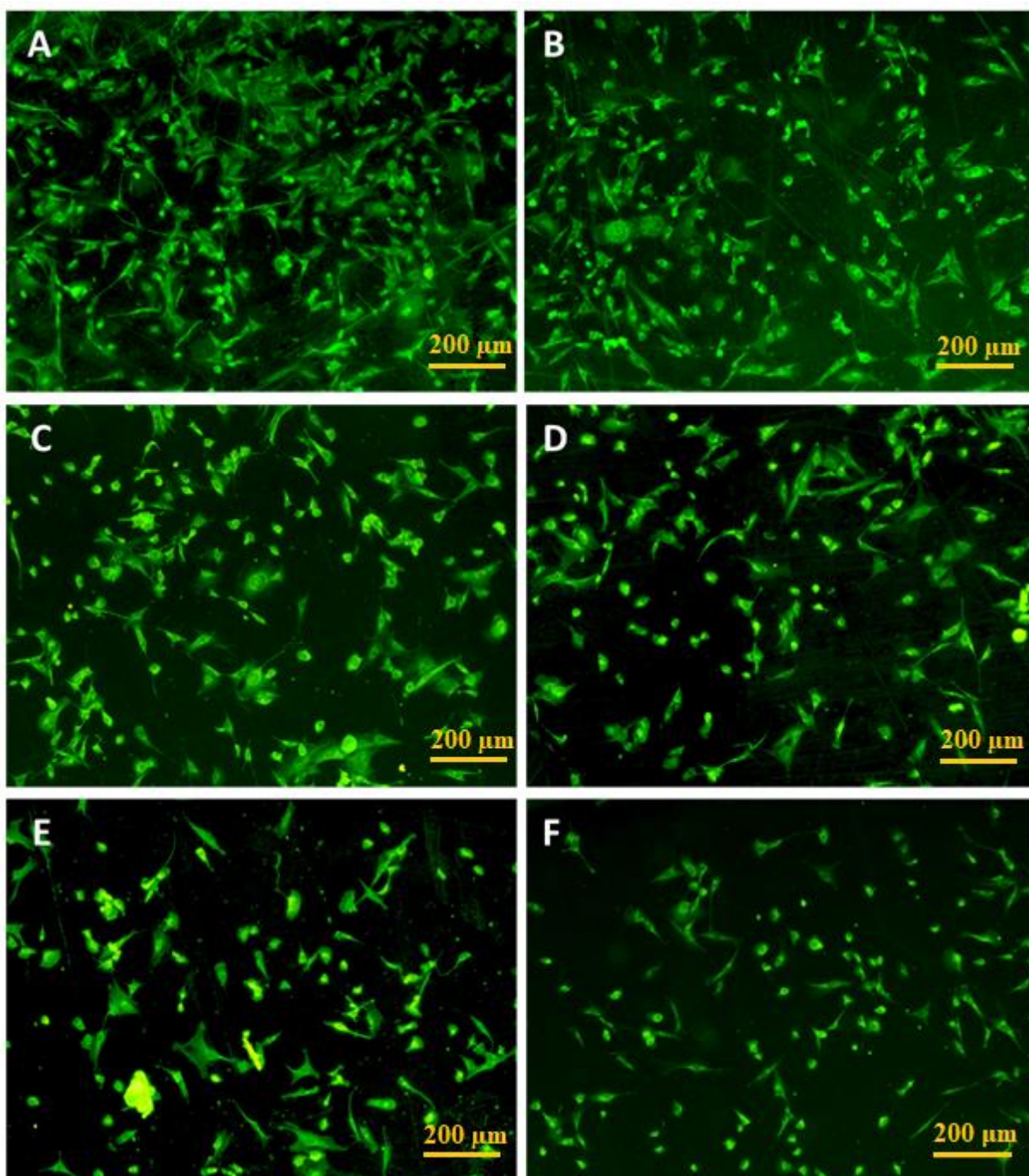
Metoda live-dead byla provedena na otiscích PET-fólií, které byly ve 24 hod. kontaktu s bakteriemi. Nebylo možné tuto metodu provádět přímo na vzorcích, neboť povrch PET fólie vykazoval autofluorescenci. Ze snímků pořízených při testování metodou live-dead byly vybrány 4 snímky zobrazené na obrázku 23. Pro ukázkou byly zvoleny snímky zachycující bakteriální kmen *E. coli* (A)(B), *S. aureus* (C) a *P. aeruginosa* (D). Vybrána byla nemodifikovaná PET fólie (A), na které je zachycena tvorba biofilmu, modifikovaný PET-C₈H₁₇ (B), na kterém lze vidět počínající biofilm. Také si můžeme všimnout tyčinkovitého tvaru bakterií *E. coli*. Modifikovaný PET-C₄H₉, na kterém je vidět *S. aureus* ve zvláštním uspořádání (hrozny) a modifikovaný PET-C₁₈H₃₇, kde je možné pozorovat jak živé, tak mrtvé bakterie. U bakteriálního kmene *P. aeruginosa* (vlivem produkce ochranné fluoreskující vrstvy) se vyskytl problém s barvením bakterií, na mikroskopu šlo vidět mnoho neobarvených bakterií, avšak nebylo možné je fotit.

5.7. CYTOTOXICITA A BIOKOMPATIBILITA PŘIPRAVENÝCH VZORKŮ

Na obrázku 24 je viditelný pokles adheze buněk k PET fóliím o delším alkylovém řetězci. Pro nemodifikovaný vzorek vyšla adheze $33\,328,2 \pm 8\,732,4 \text{ N/cm}^2$. Oproti nemodifikované PET fólii je vidět značný pokles adheze i pro modifikaci PET-CH₃, kdy jsme se dostaly na hodnotu $19\,457,7 \pm 4\,537,8$ což je méně než 60 % hodnoty dosažené pro čistou PET fólii. U modifikací PET-C₄H₉ ($14\,834,4 \pm 2\,113,4$) a PET-C₈H₁₇ ($15\,434,6 \pm 1\,657,6$) byla adheze buněk méně než poloviční. Pro modifikace s nejdelšími alkylovými řetězci PET-C₁₂H₂₅ ($11\,652,5 \pm 2\,112,7$) a PET-C₁₈H₃₇ ($11\,802 \pm 1\,007,7$) jsme docílily pouhé 35 % adheze buněk k povrchu. Závěr vyplývající z obrázku 24 podporuje obrázek 25, na kterém lze vidět patrný pokles adherujících buněk. Při focení snímků na obrázku 25 byl použit objektiv pro 10x zvětšení.



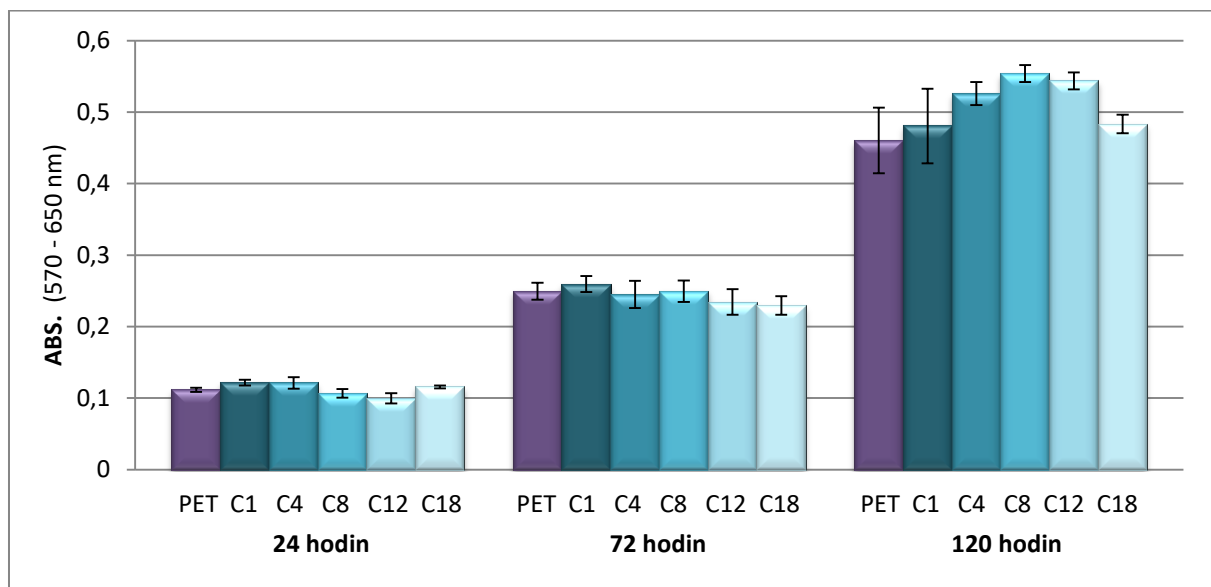
Obrázek 24 Testování adheze buněk na povrch PET fólií po 12 hodinách. Hodnoty v grafu jsou aritmetickými průměry naměřených hodnot a chyby standardně směrodatná odchylka.



Obrázek 25 Snímky z fluorescenční mikroskopie fibroblastů 3T3 adherovaných na povrch (A) neupravené PET fólie a (B) PET-CH₃, (C) PET-C₄H₉, (D) PET-C₈H₁₇, (E) PET-C₁₂H₂₅ a (F) PET-C₁₈H₃₇.

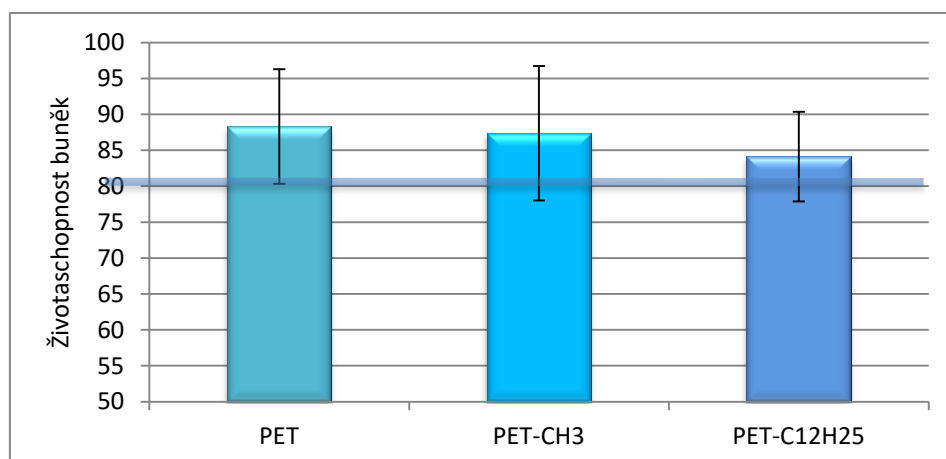
Testování proliferace buněk na modifikovaných i nemodifikovaných PET fóliích bylo vyhodnocováno pro tři časové intervaly. Námi zvolené časové intervaly byly 24 hodin, 72 hodin a 120 hodin. Měření bylo provedeno metodou MTT (test metabolické aktivity buněk). Po uplynutí daného časového úseku, byly vzorky 2 hodiny vystaveny žlutě zbarvenému roztoku 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu. Následně

byl přebytečný roztok odsán a fialově zbarvený produkt metabolické aktivity živých buněk (formazan) byl rozpuštěn v alkoholovém roztoku. Vyhodnocování měření probíhalo v 96-jamkových destičkách na multidetekčním plate readeru. Kvantifikace živých buněk proběhla na základě odečtu intenzity pozadí při 640 nm od intenzity absorpce při 570 nm.



Obrázek 26 Výsledky proliferace 3T3 fibroblastů na povrchu upravených PET fólií v porovnání s nemodifikovaným vzorkem pro různé časové intervaly.

Výsledek testování proliferace buněk je zachycen na obrázku 26. Z tohoto grafu lze vypočítat, že po 24 hodinách a po 72 hodinách s délkou uhlíkatého řetězce proliferace mírně klesá. U měření po 120 hodinách tento trend již není patrný díky velkému množství buněk. Uvedená metoda není příliš vhodná pro hodnocení testovaného typu materiálů. Při tomto měření proliferace bylo nutné PET fólie zafixovat, čímž se omezil přístup buněk k povrchu, také je nutné brát na vědomí, že metabolická aktivita se liší v rámci buněčného cyklu, což může vést ke zkreslenému výsledku.



Obrázek 27 Výsledek testu cytotoxicity ve srovnání s kontrolou buněk. Hranice 80 % představujeme minimální limit, kdy je materiál považován za biokompatibilní.⁴⁵

Testování toxicity námi připravených povrchů již bylo provedeno a publikováno pro modifikace PET-CH₃ a PET-C₁₂H₂₅, nebyly tudíž opakovány a hodnoty potřebné pro sestrojení obrázku 27 byly převzaty z publikovaného článku.⁴⁵

6. ZÁVĚR

- ❖ Úspěšně se podařilo modifikovat PET fólie pěti Grignardovými činidly o různě dlouhém alkylovém řetězci (C_1, C_4, C_8, C_{12} a C_{18}), které by měly v závislosti na délce alkylového řetězce eliminovat vznik biofilmu na jejich povrchu.
- ❖ Za pomoci měření kontaktního úhlu vody se podařilo potvrdit změnu hydrofobicity v závislosti na délce alkylového řetězce. S prodlužujícím se řetězcem se zvyšuje kontaktní úhel (klesá volná povrchová energie), tudíž roste hydrofobicita připravených vzorků.
- ❖ Z testů tří patogenních biofilm aktivních bakteriálních kmenů bylo potvrzeno, že *E.coli* k rovným, hladkým povrchům nemá tendenci adherovat a tvořit biofilm. Naopak *P. aeruginosa* námi připravené vzorky nijak zvlášť nevadily, docházelo k její výrazné proliferaci a vzniku biofilmové vrstvy, která však byla výrazně tenčí v porovnání s nemodifikovanými vzorky. Proliferace *S. aureus* byla jen o trochu vyšší než *E.coli*, ale při vytřepávání PET folií se uvolňoval nejvíce.
- ❖ Z testů cytotoxicity je patrné že s rostoucím alkylovým řetězcem se snižuje adheze buněk k povrchu vzorků, nicméně všechny připravené vzorky jsou pro buňky netoxické. Viabilita buněk byla ve všech případech vyšší než 80 %, tudíž je můžeme označit za biokompatibilní.
- ❖ Modifikace polyethylentereftalátu pomocí reakce s Grignardovými činidly je nová metoda, která byla v rámci naší skupiny úspěšně publikována v impaktovaném časopise Journal of Applied Polymer Science v březnu tohoto roku. Na uvedené problematice je stále velké množství věcí k objasnění a porozumění, rády bychom se proto této problematice věnovaly i nadále, povrchy lépe analyzovaly pomocí metody XPS a metody měření fluorescenční intenzity, na které aktuálně pracujeme s cílem připravit takový povrch, který bude jednoznačně eliminovat vznik patogenních biofilmů.

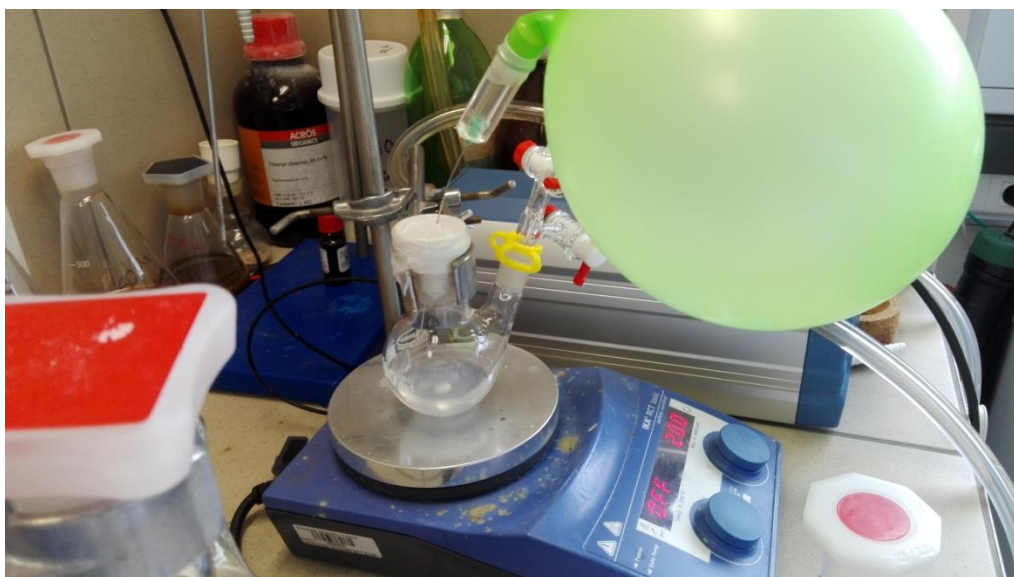
7. POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Muñoz-Bonilla, A.; Cerrada, M.; Fernández-García, M. *Polymeric Materials with Antimicrobial Activity: From Synthesis to Applications*; Royal Society of Chemistry, 2013, 432, ISBN: 978-1-84973-807-1.
- (2) Ulery, B. D.; Nair, L. S.; Laurencin, C. T. *J. Polym. Sci. Part B-Polym. Phys.* **2011**, 49 (12), 832–864.
- (3) GALATÍK, L. Kde nalezneme plasty v medicíně? *MM Průmyslové spektrum* [online], 2012, (1), s. 44. Dostupné z <<http://www.mmspektrum.com/clanek/kde-nalezneme-plasty-v-medicine.html>>
- (4) Sírka Optilene® LP. [online]. [cit. 2017-5-10]. Dostupné z <<http://www.bbraun.cz/cps/rde/xchg/cw-bbraun-cs-cz/hs.xsl/products.html?id=00020741900000000409&prid=PRID00003022>>
- (5) Léčba mužské stresové inkontinence moči. [online]. [cit. 2017-5-10]. Dostupné z <<http://www.bbraun.cz/cps/rde/xchg/cw-bbraun-cs-cz/hs.xsl/products.html?id=00020741900002086884&prid=PRID00006021#>>
- (6) Zhao, X.; Courtney, J. M. *Update on Medical Plasticised PVC*; iSmithers Rapra Publishing, 2009, 120, ISBN: 978-1-84973-807-1.
- (7) ISBT 128 Blood Bag Labels. [online]. [cit. 2017-4-28]. Dostupné z <<http://www.rmsomega.com/healthcare/consumables/labels-printing-supplies/blood-bag-labels/>>
- (8) Vargas, K. F.; Borghetti, R. L.; Moure, S. P.; Salum, F. G.; Cherubini, K.; de Figueiredo, M. A. Z. *Gerodontology* **2012**, 29 (2), e16-22.
- (9) Jozef, R.; Jana, V.; Hana, K.; Jiří, S. In *Biofyzika: Pro zdravotnické a biomedicínské obory*; Grada Publishing a.s., 2013, 53-58, ISBN: 978-80-247-8498-4.
- (10) Roll, S.; Müller-Nordhorn, J.; Keil, T.; Scholz, H.; Eidt, D.; Greiner, W.; Willich, S. N. *BMC Surg.* **2008**, 8, 22.
- (11) Lam, M. T.; Wu, J. C. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **2012**, 10 (8), 1039–1049.
- (12) Banerjee, I.; Pangule, R. C.; Kane, R. S. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla.* **2011**, 23 (6), 690–718.
- (13) Barrett, D. G.; Yousaf, M. N. *Mol. Basel Switz.* **2009**, 14 (10), 4022–4050.
- (14) Silver Graft. B. Braun Medical s.r.o. [online]. [cit. 2017-5-10]. Dostupné z <<http://www.bbraun.cz/cps/rde/xchg/cw-bbraun-cs-cz/hs.xsl/products.html?acs=1&prid=PRID00003021&id=00020741900002086879>>
- (15) Whinfield, J. R.; Dickson, J. T. Polymeric linear terephthalic esters.
- (16) Favaro, S. L.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C.; Radovanovic, E. *Polym. Degrad. Stab.* **2007**, 92 (7), 1219–1226.
- (17) Zhu, Y.; Mao, Z.; Gao, C. *Rsc Adv.* **2013**, 3 (8), 2509–2519.
- (18) Characklis, W. G.; Wilderer, P. A. *Structure and function of biofilms: report of the Dahlem Workshop on Structure and Function of Biofilms, Berlin, 1988, November 27-December 2*; Wiley, 1989, 412, ISBN: 978-0-471-92480-7.
- (19) Beloin, C.; Ghigo, J. M. *Trends Microbiol.* **2005**, 13 (1), 16–19.
- (20) van Loosdrecht, M. C. M.; Heijnen, J. J.; Eberl, H.; Kreft, J.; Picioreanu, C. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **2002**, 81 (1–4), 245–256, ISSN: 0003-6072.
- (21) Schindler, J. *Ze života bakterií*; Academia, 2008, 143, ISBN: 9788020016669 802001666X.
- (22) Rulík, M.; fakulta, U. P. P. *Mikrobiální biofilmy*; Univerzita Palackého v Olomouci, 2011, 447, ISBN: 978-80-244-2747-8.
- (23) Neu, T. R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* **1996**, 60 (1), 151-166.
- (24) Dohnalkova, A. C.; Arey, B. W.; Williams, K. H.; Marshall, M. J. *Microsc. Microanal.* **2009**, 15, 66–67.
- (25) Rickard, A. H.; Gilbert, P.; High, N. J.; Kolenbrander, P. E.; Handley, P. S. *Trends*

- Microbiol.* **2003**, *11* (2), 94–100.
- (26) Hall-Stoodley, L.; Stoodley, P. *Trends Microbiol.* **2005**, *13* (1), 7–10.
 - (27) Costerton, J.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D.; Korber, D.; Lappinscott, H. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*, 711–745.
 - (28) Macela, A. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*; Grada Publishing a.s., 2006, 214, ISBN: 978-80-247-0664-1.
 - (29) Mueller, W. H. Bacteria Protocol - Critical Point Drying of E. coli for SEM. *Leica Sci.* [online] **2016**. Dostupné z <<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/bacteria-protocol-critical-point-drying-of-e-coli-for-sem/>>
 - (30) Klaban, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*; Galén, 2005, 654, ISBN: 978-80-7262-341-9.
 - (31) Micro-organisme. Wikiwand [online]. [cit. 2017-5-10]. Dostupné z <<http://www.wikiwand.com/nl/Micro-organisme>>
 - (32) Emily Osier, M. D.; Catalina Matiz, M. D.; Fred Ghali, M. D.; Lawrence Eichenfield, M. D. Staphylococcus aureus infections in atopic dermatitis [online]. [cit. 2017-4-29]. Dostupné z <<http://contemporarypediatrics.com/contemporary-pediatrics/news/staphylococcus-aureus-infections-atopic-dermatitis>>
 - (33) Maďar, R.; Podstatová, R.; Řehořová, J. *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*; Grada Publishing a.s., 2006, 182, ISBN: 978-80-247-6277-7.
 - (34) Freeman-Cook, L.; Freeman-Cook, K. D.; Alcamo, I. E. *Staphylococcus Aureus Infections*; Infobase Publishing, 2006, 183, ISBN: 978-1-4381-0168-2.
 - (35) Pseudomonas Aeruginosa Biofilm Related Keywords & Suggestions [online]. [cit. 2017-4-29] Dostupné z <<http://www.keyword-suggestions.com/cHNldWRvbW9uYXMgYWVydWdpbm9zYSBiaW9maWxt/>>
 - (36) A leg ulcer infected with Pseudomonas aeruginosa that produces green pigmentation. [online]. [cit. 2017-5-11]. Dostupné z <<http://www.medetec.co.uk/slide%20scans/leg-ulcer-images/target53.html>>
 - (37) Klouda, P. *Moderní analytické metody: učebnice základů instrumentálních analytických metod*; Pavel Klouda, 1996, 203, ISBN: 978-80-902155-0-4.
 - (38) Buršíková, V.; Sťahel, P.; Navrátil, Z.; Buršík, J.; Janča, J. *Surface Energy Evaluation of Plasma Treated Materials by Contact Angle Measurement*; Masaryk University, 2004, 70, ISBN: 978-80-210-3563-8.
 - (39) Kwok, D. Y.; Gietzelt, T.; Grundke, K.; Jacobasch, H. J.; Neumann, A. W. *Langmuir* **1997**, *13* (10), 2880–2894.
 - (40) Haugstad, G. *Atomic Force Microscopy: Understanding Basic Modes and Advanced Applications*; John Wiley & Sons, 2012, 668, ISBN: 978-1-118-36068-2.
 - (41) Marrie, T. J.; Costerton, J. W. *J. Clin. Microbiol.* **1984**, *19* (5), 687–693.
 - (42) Beech, I. B.; Cheung, C. W.; Johnson, D. B.; Smith, J. R. *Biofouling* **1996**, *10* (1–3), 65–77, 0892-7014.
 - (43) Knowles, W. R. Environmental scanning electron microscope. US5412211 A.
 - (44) Drop Shape Analyzer – DSA30B. [online]. [cit. 2017-5-11]. Dostupné z <<https://www.kruss.de/products/contact-angle/dsa30/drop-shape-analyzer-dsa30b/>>
 - (45) Swar, S.; Zajícová, V.; Rysová, M.; Lovětinská-Šlamborová, I.; Voleský, L.; Stibor, I. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (26), 29, DOI: 10.1002/APP.44990.
 - (46) Zhang, X.; Wang, L.; Levänen, E. *RSC Adv* **2013**, *3*, 2046-2069.
 - (47) Ong, Y.-L.; Razatos, A.; Georgiou, G.; Sharma, M. M. *Langmuir* **1999**, *15* (8), 2719–2725.
 - (48) Absolom, D. R.; Lamberti, F. V.; Policova, Z.; Zingg, W.; Oss, C. J. van; Neumann, A. W. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *46* (1), 90–97.

8. PŘÍLOHY

8.1. Funkcionalizace PET fólií

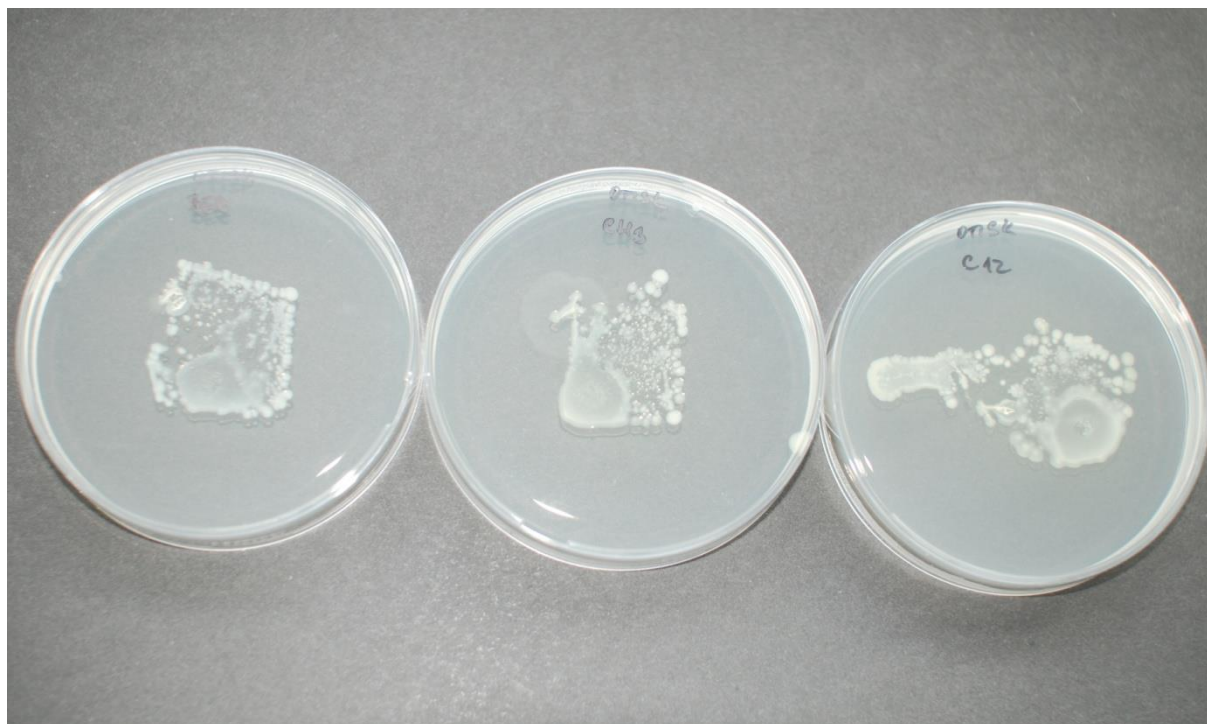


Funkcionalizace PET (během reakce).

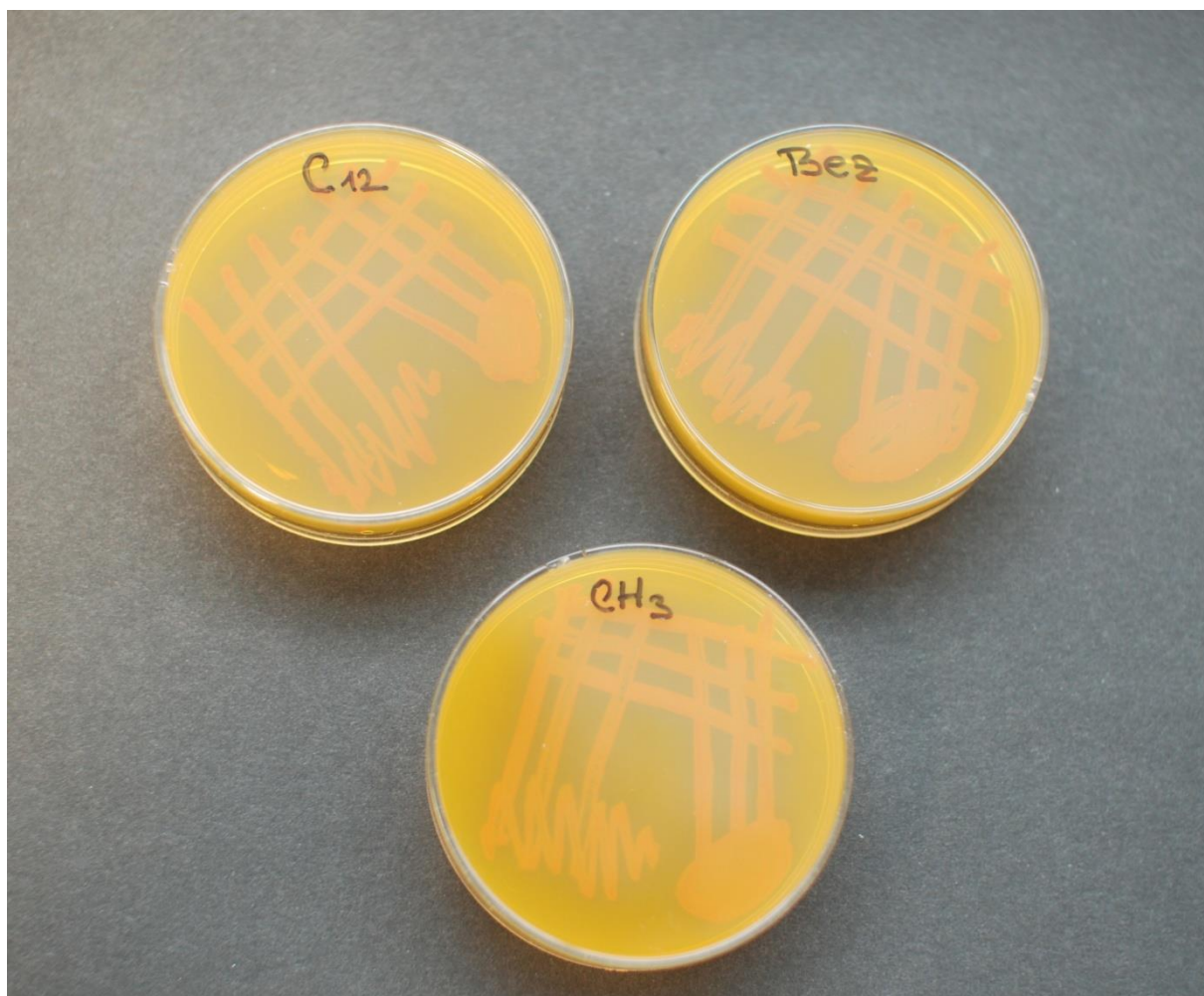


Při nedokonalém připravení inertního prostředí bez známky vlhkosti došlo k vysrážení soli a modifikace se musela opakovat.

8.2. Testování bakterií

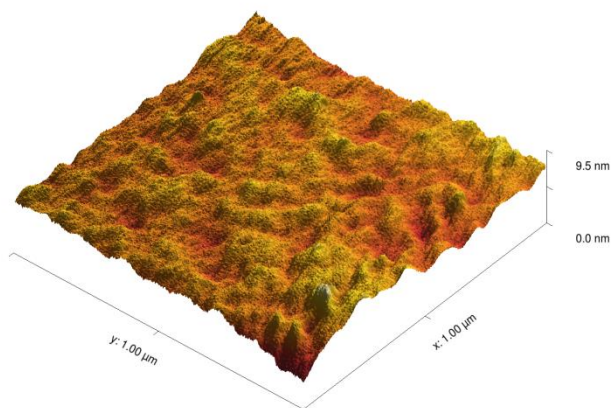


Otisky provedené z povrchu PET folie po 24 hod. kontaktu s bakteriemi *E.coli*.

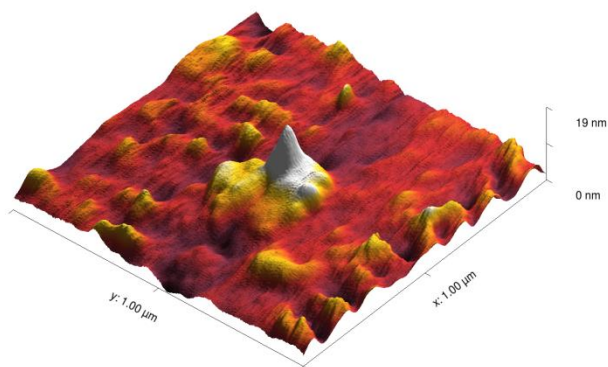


Test specifickým agarem (původně zelený agar po naočkování *E. coli* změnil barvu na oranžovou).

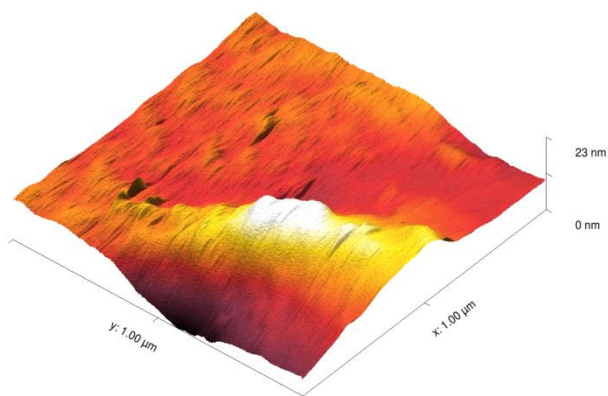
8.3. Změna drsnosti PET fólií sledovaná pomocí AFM rozměr 1x1 μm



Čistá PET fólie

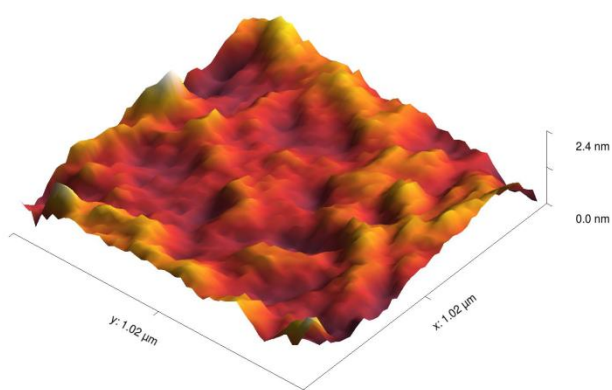


**PET fólie po 2 hodinách
v DEE**

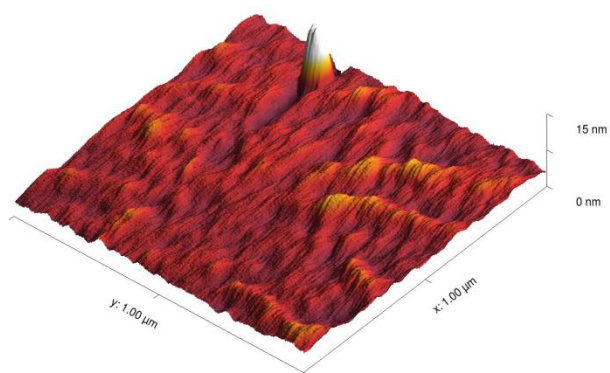


PET fólie po modifikaci

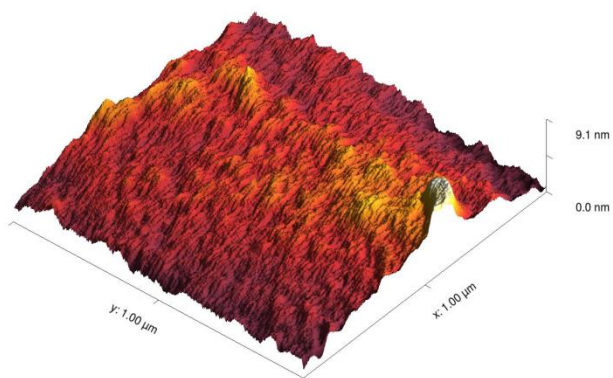
Změna drsnosti vzorku o výsledné modifikaci PET-CH₃.



Čistá PET fólie

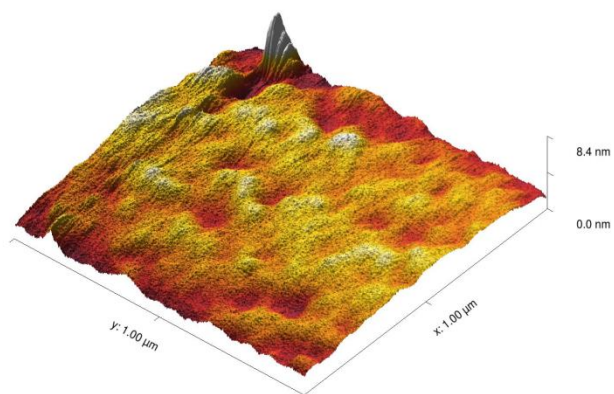


**PET fólie po 2 hodinách
v DEE**

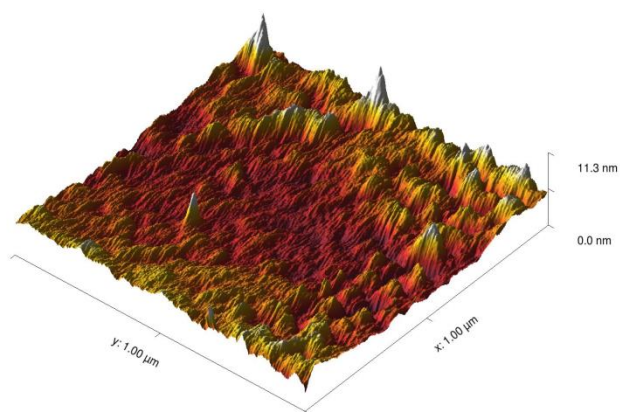


PET fólie po modifikaci

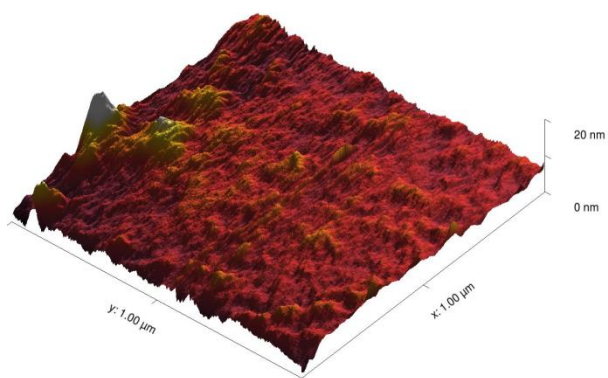
Změna drsnosti vzorku o výsledné modifikaci PET-C₄H₉.



Čistá PET fólie

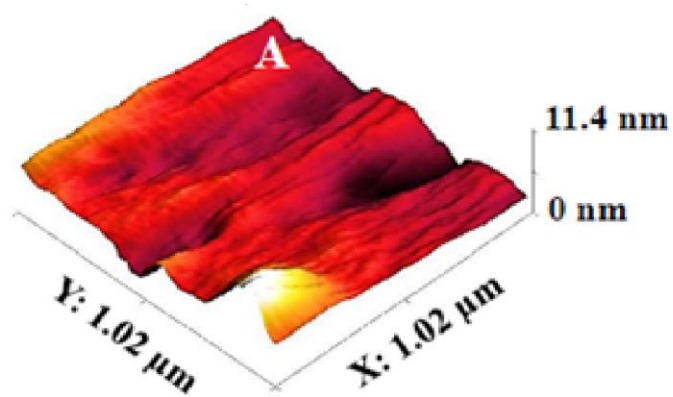


**PET fólie po 2 hodinách
v DEE**

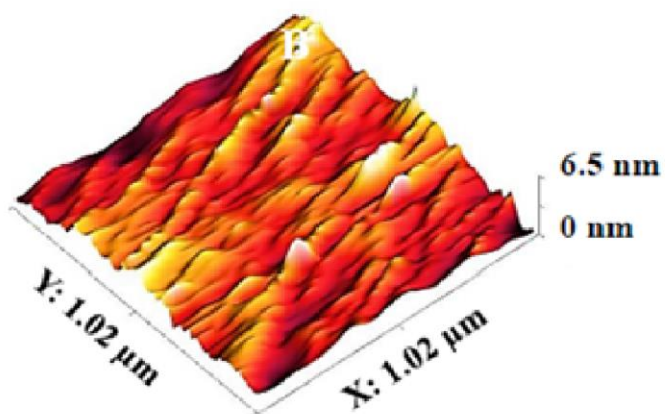


PET fólie po modifikaci

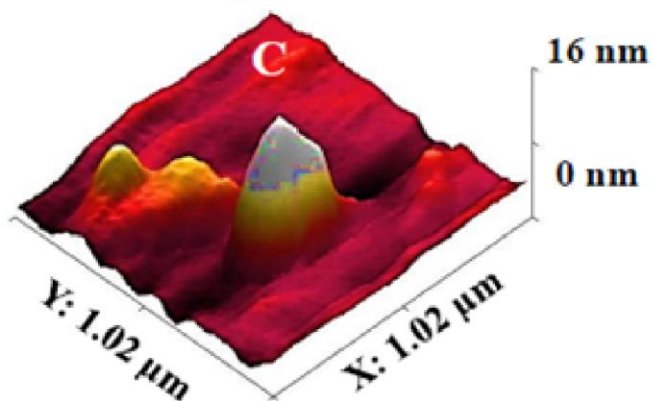
Změna drsnosti vzorku o výsledné modifikaci PET-C₈H₁₇.



Čistá PET fólie

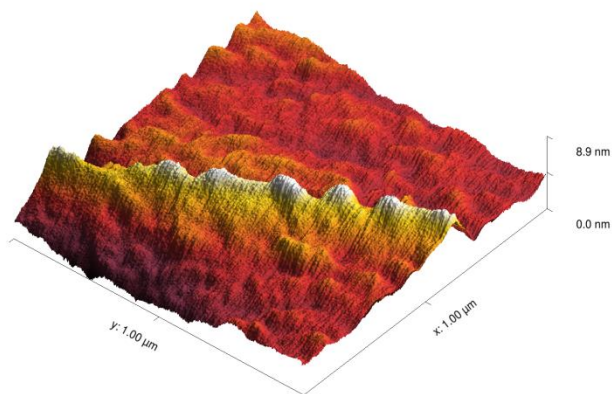


**PET fólie po 2 hodinách
v DEE**

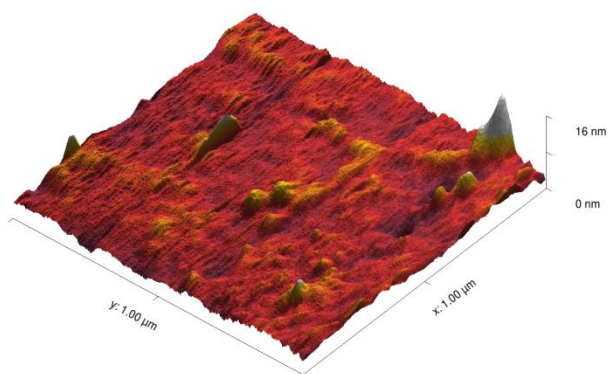


PET fólie po modifikaci

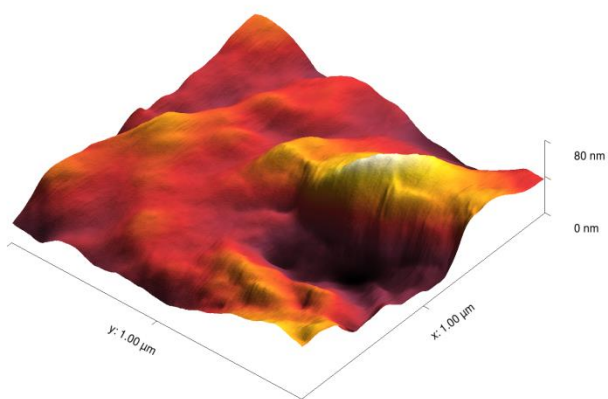
Změna drsnosti vzorku o výsledné modifikaci PET-C₁₂H₂₅.



Čistá PET fólie



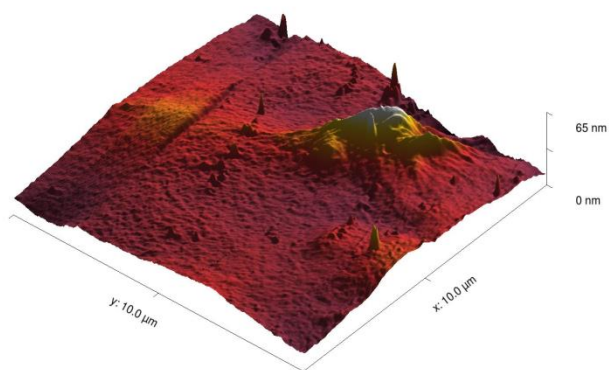
**PET fólie po 2 hodinách
v DEE**



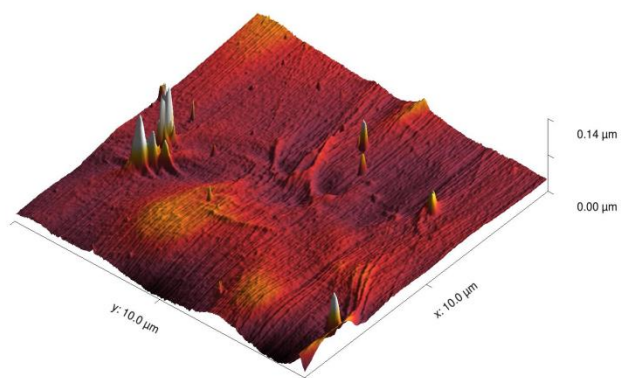
PET fólie po modifikaci

Změna drsnosti vzorku o výsledné modifikaci PET-C₁₈H₃₇.

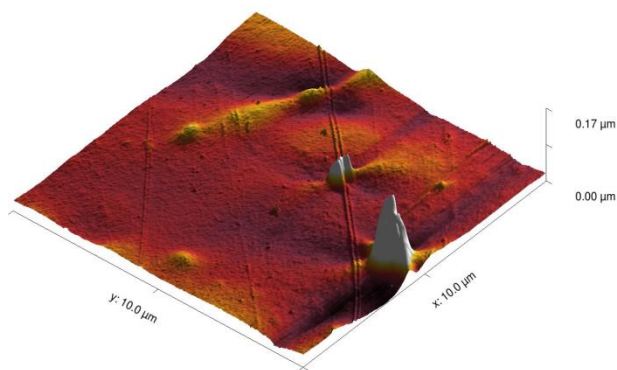
8.4. Změna drsnosti PET fólií sledovaná pomocí AFM na rozměru 10x10 μm



Čistá PET fólie

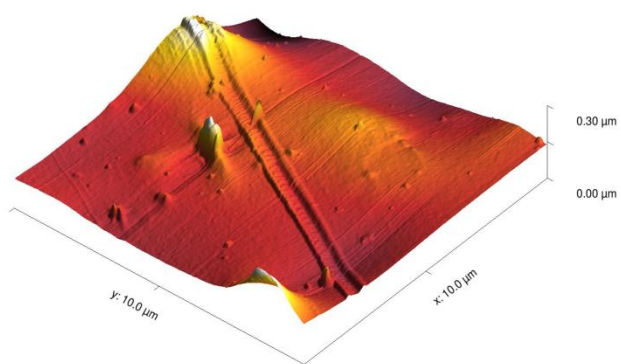


**PET fólie po 2 hodinách
v DEE**

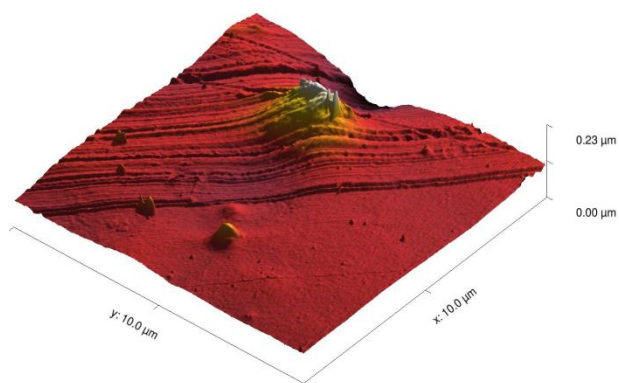


PET fólie po modifikaci

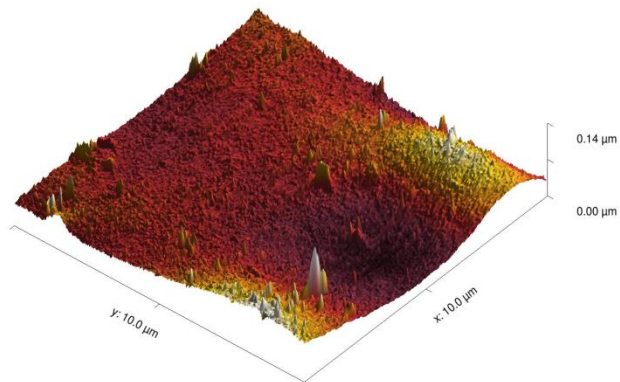
Změna drsnosti vzorku o výsledné modifikaci PET-C₄H₉.



Čistá PET fólie



**PET fólie po 2 hodinách
v DEE**



PET fólie po modifikaci

Změna drsnosti vzorku o výsledné modifikaci PET-C₈H₁₇.